

B8

METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE

Publication number: WO02055693

Publication date: 2002-07-18

Inventor: KREUTZER ROLAND (DE); LIMMER STEPHAN (DE); ROST SYLVIA (DE); HADWIGER PHILIPP (DE)

Applicant: RIBOPHARMA AG (DE); KREUTZER ROLAND (DE); LIMMER STEPHAN (DE); ROST SYLVIA (DE); HADWIGER PHILIPP (DE)

Classification:

- international: C12N15/09; A61K9/127; A61K31/7105; A61K31/7115; A61K31/7125; A61K47/34; A61K47/48; A61K48/00; A61P5/00; A61P9/00; A61P25/28; A61P31/12; A61P33/06; A61P35/00; A61P35/04; A61P37/02; A61P43/00; C07H21/02; C12N15/11; A61K38/00; C12N15/09; A61K9/127; A61K31/7105; A61K31/7115; A61K31/7125; A61K47/34; A61K47/48; A61K48/00; A61P5/00; A61P9/00; A61P25/00; A61P31/00; A61P33/00; A61P35/00; A61P37/00; A61P43/00; C07H21/00; C12N15/11; A61K38/00; (IPC1-7): C12N15/11

- European: C12N15/11B7

Application number: WO2002EP00152 20020109

Priority number(s): DE20011000586 20010109; DE20011055280 20011026; DE20011058411 20011129; DE20011060151 20011207

Also published as:

WO02055693 (A3)
EP1352061 (A3)
EP1352061 (A2)
US2004175703 (A1)
EP1352061 (A0)

more >>

Cited documents:

WO0044895
WO9805770
WO9932619
WO0044914
WO9401550

more >>

Report a data error here

Abstract of WO02055693

The invention relates to a method for inhibiting the expression of a target gene in a cell, comprising the following steps: introduction of an amount of at least one dual-stranded ribonucleic acid (dsRNA I) which is sufficient to inhibit the expression of the target gene. The dsRNA I has a dual-stranded structure formed by a maximum of 49 successive nucleotide pairs. One strand (as1) or at least one section of the one strand (as1) of the dual-stranded structure is complementary to the sense strand of the target gene. The dsRNA has an overhang on the end (E1) of dsRNA I formed by 1 - 4 nucleotides.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055693 A2

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/11

LIMMER, Stephan [DE/DE]; Universitätsstrasse 30,
95447 Bayreuth (DE). ROST, Sylvia [DE/DE]; Univer-
sitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). HADWIGER,
Philipp [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00152

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Januar 2002 (09.01.2002)

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nögelsbachstrasse 49a,
91052 Erlangen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 00 586.5 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

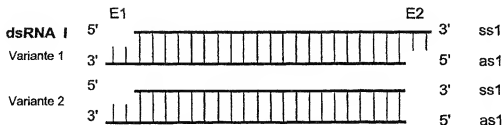
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Universitätsstrasse
30, 95447 Bayreuth (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINE ZIELGENS



(57) Abstract: The invention relates to a method for inhibiting the expression of a target gene in a cell, comprising the following steps: introduction of an amount of at least one dual-stranded ribonucleic acid (dsRNA I) which is sufficient to inhibit the expression of the target gene. The dsRNA I has a dual-stranded structure formed by a maximum of 49 successive nucleotide pairs. One strand (as1) or at least one section of the one strand (as1) of the dual-stranded structure is complementary to the sense strand of the target gene. The dsRNA has an overhang on the end (E1) of dsRNA I formed by 1 - 4 nucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte: Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinn-Strang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA am einen Ende (E1) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.



Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens

Die Erfindung betrifft ein Verfahren, eine Verwendung und ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens.

5

Aus der WO 99/32619 sowie der WO 00/44895 sind Verfahren zur Hemmung der Expression von medizinisch oder biotechnologisch interessanten Genen mit Hilfe einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) bekannt. Die bekannten Verfahren sind zwar
10 hoch effektiv. Es besteht gleichwohl das Bedürfnis, deren Effizienz weiter zu steigern.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere
15 ein Verfahren, eine Verwendung und ein Medikament angegeben werden, mit denen eine noch effizientere Hemmung der Expression eines Zielgens erreichbar ist.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 41 und
20 81 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 40, 42 bis 80 und 82 bis 120.

Mit den erfindungsgemäß beanspruchten Merkmalen wird überraschenderweise eine drastische Erhöhung der Effektivität der
25 Hemmung der Expression eines Zielgens in vitro und in vivo erreicht. Durch die besondere Ausbildung der Enden der dsRNA kann sowohl deren Effizienz bei der Vermittlung der hemmenden Wirkung auf die Expression eines Zielgens als auch deren Stabilität gezielt beeinflusst werden. Durch die Vergößerung der
30 Stabilität wird die wirksame Konzentration in der Zelle erhöht.

Unter einem "Zielgen" im Sinne der Erfindung wird der DNA-Strang der doppelsträngigen DNA in der Zelle verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matritze dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Be-
35

reiche ist. Bei dem "Zielgen" handelt es sich also im allgemeinen um den Sinnstrang. Der eine Strang bzw. Antisinnstrang (as1) kann komplementär zu einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder deren Prozessierungsprodukt, z.B. eine mRNA, sein. Unter "Einführen" wird die Aufnahme in die Zelle verstanden. Die Aufnahme kann durch die Zelle selbst erfolgen; sie kann auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden. Unter einem "Überhang" wird ein endständiger einzelsträngiger Überstand verstanden, welcher nicht nach Watson & Crick gepaarte Nukleotide aufweist. Unter einer "doppelsträngigen Struktur" wird eine Struktur verstanden, bei der die Nukleotide der Einzelstränge im Wesentlichen nach Watson & Crick gepaart sind. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann eine doppelsträngige Struktur auch einzelne Fehlpaarungen ("Mismatches") aufweisen.

Nach einer besonderes vorteilhaften Ausgestaltung weist die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs bzw. Antisinnstrangs as1 und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs bzw. Sinnstrang ss1 auf. Die dsRNA I kann auch an einem Ende glatt ausgebildet sein. In diesem Fall befindet sich das glatte Ende vorteilhafterweise auf der Seite der dsRNA I, die das 5'-Ende des einen Strangs (Antisinnstrang; as1). In dieser Ausbildung zeigt die dsRNA I einerseits eine sehr gute Effektivität und andererseits eine hohe Stabilität im lebenden Organismus. Die Effektivität insgesamt in vivo ist hervorragend. Der Überhang ist zweckmäßigerweise aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise aus 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal kann die Effektivität des Verfahrens weiter erhöht werden, wenn zumindest eine entsprechend der erfindungsgemäßen dsRNA I ausgebildete weitere dsRNA II in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs der doppelsträngigen Struktur der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich des Sinnstrangs des Zielgens ist, und wobei

ein weiterer Strang oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs der doppelsträngigen Struktur der weiteren dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich des Sinnstrangs des Zielgens ist. Die Hemmung der Expression des Zielgens ist in diesem Fall deutlich gesteigert. Der erste und der zweite Bereich können abschnittsweise überlappen, aneinander grenzen oder auch voneinander beabstandet sein.

Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, wenn die dsRNA I und/oder die weitere dsRNA II eine Länge von weniger als 25 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweisen. Als besonders effektiv hat sich eine Länge im Bereich zwischen 19 und 23 Nukleotidpaaren erwiesen. Die Effizienz kann weiter gesteigert werden, wenn an den vorzugsweise aus 19 bis 23 Nukleotidpaaren gebildeten Doppelsträngen einzelsträngige Überhänge von 1 bis 4 Nukleotiden vorhanden sind.

Das Zielgen kann nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal eine der in dem anhängenden Sequenzprotokoll wiedergegebenen Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweisen. Es kann auch aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene zur Expression von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierende Molekülen sowie Gene zur Expression des EGF-Rezeptors. Beim Zielgen kann es sich insbesondere um das MDRI-Gen handeln. Es kann in diesem Zusammenhang eine der Sequenzen SQ141 - 173 bestehende bzw. ein aus jeweils zusammengehörenden Antisinn (as)- und Sinnsequenzen (ss) kombinierte dsRNA I/II verwendet werden.

Nach einem weiteren vorteilhaften Ausgestaltungsmerkmal wird die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt.

Das Zielgen wird zweckmäßigerweise in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert. Es kann Bestandteil eines Virus oder Viroids, insbesondere eines humanpathogenen Virus oder Viroids, sein. Das Virus oder Viroid kann auch ein
5 tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein.

Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist vorgesehen, dass die ungepaarten Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

10

Zumindest ein Ende der dsRNA I/II kann modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Vorteilhafterweise wird dazu der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt
15 der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht. Die chemische Verknüpfung kann durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-
20 Ionenkoordination gebildet werden. Es hat sich weiter als zweckmäßig und die Stabilität erhöhend erwiesen, wenn die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes gebildet ist. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen hinsichtlich der chemischen Verknüpfung können den Merkmalen der Ansprüche 24
25 bis 30 entnommen werden, ohne dass es dafür einer näheren Erläuterung bedarf.

Die dsRNA I/II kann dann besonders einfach in die Zelle eingeschleust werden, wenn sie in micellare Strukturen, vorteil-
30 hafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird. Zum Transport der dsRNA I/II in die Zelle hat es sich auch als vorteilhaft erwiesen, dass diese an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon um-
35 geben werden. Das Hüllprotein kann vom Polyomavirus abgeleitet sein. Das Hüllprotein kann insbesondere das Virus-Protein

1 und/oder das Virus-Protein 2 des Polyomavirus enthalten. Nach einer weiteren Ausgestaltung ist vorgesehen, dass bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist. Ferner ist es von Vorteil, dass der eine Strang der dsRNA I/II (as1/2) zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist. Die Zelle kann eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

Weiterhin hat es sich gezeigt, dass die dsRNA I/II vorteilhafterweise bereits in einer Menge von höchstens 5 mg/kg Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht werden kann. Bereits in dieser geringen Dosis wird eine ausgezeichnete Effektivität erzielt.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen und dann oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht werden kann.

Erfindungsgemäß ist weiterhin die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (Antisinnstrang; as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinnstrang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA I zumindest an einem Ende einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist ein Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle vorgesehen, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausrei-

chenden Menge, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur
5 komplementär zum Sinnstrang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA I zumindest an einem Ende einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der dsRNA I/II
10 wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen und Ausführungsbeispiele beispielhaft erläutert. Es zeigen:

15 Fig. 1a, b schematisch eine erste und zweite doppelsträngige RNA und

Fig. 2 schematisch ein Zielgen,

20 Fig. 3 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (erstes Experiment),

Fig. 4 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (zweites Experiment),
25

Fig. 5 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (drittes Experiment),
30

Fig. 6 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in NIH/3T3-Zellen (viertes Experiment),
35

- Fig. 7 relative YFP-Fluoreszenz nach Applikation verschiedener dsRNA in HeLa-S3-Zellen (fünftes Experiment),
- 5 Fig. 8 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NIH/3T3-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-YFP bzw nach Kotransfektion mit pcDNA-YFP und verschiedenen dsRNAs,
- 10 Fig. 9 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HeLa-S3-Zellen nach Transfektion mit pcDNA-YFP bzw. nach Kotransfektion mit pcDNA-YFP und verschiedenen dsRNAs,
- 15 Fig. 10 gelelektrophoretische Auftrennung von S1 nach Inkubation in Maus-Serum,
- Fig. 11 gelelektrophoretische Auftrennung von S1 nach Inkubation in humanem Serum,
- 20 Fig. 12 gelelektrophoretische Auftrennung von S7 nach Inkubation in Maus-Serum,
- Fig. 13 gelelektrophoretische Auftrennung von S7 nach Inkubation in humanem Serum,
- 25 Fig. 14 gelelektrophoretische Auftrennung von K3 nach Inkubation in Maus-Serum,
- 30 Fig. 15 gelelektrophoretische Auftrennung von PKC1/2 nach Inkubation in Maus-Serum,
- Fig. 16 gelelektrophoretische Auftrennung von S1A/S4B nach Inkubation in humanem Serum,

- Fig. 17 gelelektrophoretische Auftrennung von K2 nach Inkubation in humanem Serum und
- 5 Fig. 18 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Nieren-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- Fig. 19 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Herz-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- 10 Fig. 20 GFP-spezifische Immunoperoxidase-Färbung an Pankreas-Paraffinschnitten transgener GFP-Mäuse,
- Fig. 21 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im Plasma,
- 15 Fig. 22 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression in der Niere,
- 20 Fig. 23 Western-Blot-Analyse der GFP-Expression im Herz,
- Fgi. 24 Western-Blot-Analyse der EGFR-Expression in U-87 MG Glioblastom-Zellen,
- 25 Fig. 25a Northern-Blot-Analyse des MDRI mRNA-Niveaus in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T, wobei die Zellen nach 74 Stunden geerntet wurden,
- 30 Fig. 25b Quantifizierung der Banden nach Fig. 25a, wobei die Mittelwerte aus zwei Werten dargestellt sind,
- Fig. 26a Northern-Blot-Analyse des MDRI mRNA-Niveaus in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T, wobei die Zellen nach 48 Stunden geerntet wurden,
- 35

Fig. 26b Quantifizierung der Banden nach Fig. 26a, wobei die Mittelwerte aus zwei Werten dargestellt sind,

Fig. 27 vergleichende Darstellung einer durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme einer Transfektion mit 175 nM dsRNA (Sequenz R1 in Tabelle 4).

Die in den Fig. 1a und 1b schematisch gezeigten doppelsträngigen Ribonukleinsäuren dsRNA I und dsRNA II weisen jeweils ein erstes Ende E1 und ein zweites Ende E2 auf. Die erste und die zweite Ribonukleinsäure dsRNA I/dsRNAII weisen an ihren beiden Enden E1 und E2 einzelsträngige, aus etwa 1 bis 4 ungepaarten Nukleotiden gebildete Abschnitte auf. Es sind zwei mögliche Varianten dargestellt (Variante 1 und 2), wobei Variante 2 ein glattes Ende (E2) aufweist. Das glatte Ende kann jedoch auch in einer weiteren Variante am anderen Ende (E1) liegen.

In Fig. 2 ist schematisch ein auf einer DNA befindliches Zielgen gezeigt. Das Zielgen ist durch einen schwarzen Balken kenntlich gemacht. Es weist einen ersten Bereich B1 und einen zweiten Bereich B2 auf.

Jeweils der eine Strang der ersten dsRNA I (as1) bzw. der zweiten dsRNA II (as2) ist komplementär zum entsprechenden Bereich B1 bzw. B2 auf dem Zielgen.

Die Expression des Zielgens wird dann besonders wirkungsvoll gehemmt, wenn die dsRNA I/dsRNA II an ihren Enden E1, E2 einzelsträngige Abschnitte aufweist. Die einzelsträngigen Abschnitte können sowohl am Strang as1 oder as2 als auch am Gegenstrang (ss1 bzw. ss2) oder am Strang as1, as2 und am Gegenstrang ausgebildet sein.

Die Bereiche B1 und B2 können, wie in Fig. 2 gezeigt, von einander beabstandet sein. Sie können aber auch aneinander grenzen oder überlappen.

5

I. Hemmung der Expression des YFP-Gens in Fibroblasten:

Es wurden aus Sequenzen des Yellow Fluorescent Proteine (YFP), einer Variante des GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) der Alge *Aequoria victoria* abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) hergestellt und zusammen mit einem YFP-kodierenden Plasmid in Fibroblasten mikroinjiziert. Anschließend wurde die Fluoreszenzabnahme gegenüber Zellen ohne dsRNA ausgewertet.

15 Versuchsprotokoll:

Mittels eines RNA-Synthesizer (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen SQ148, 149 und SQ159 ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung mit Hilfe der HPLC. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur. Die so erhaltenen dsRNAs wurden in die Testzellen mikroinjiziert.

Als Testsystem für diese Zellkultur-Experimente diente die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH/3T3, ECACC No. 93061524 (European Collection of Animal Cell Culture). Für die Mikroinjektionen wurde das Plasmid pcDNA-YFP verwendet, das ein 800bp großes Bam HI/Eco RI-YFP-Fragment in den entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Vectors pcDNA3 enthält. Die Expression des YFP wurde unter dem Einfluß gleichzeitig mit-transfizierter sequenzhomologer dsRNA untersucht. Die Auswer-

tung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte frühestens 3 Stunden nach Injektion anhand der grünen Fluoreszenz.

Vorbereitung der Zellkulturen:

- 5 Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom) im Brutschrank unter 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C. Die Zellen wurden alle 3 Tage passagiert, um sie in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten. Einen Tag vor der Durchführung der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/TEDTA, Biochrom) und mit einer Zelldichte von $0,3 \times 10^5$ Zellen in beschichteten Petrischalen (CORNING® Cell Culture Dish, 35 mm, Corning Inc., Corning, USA) ausgesät. Die Petrischalen wurden mit 0,2 % Gelatine (Biochrom) für mindestens 30 Minuten bei 37°C inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und sofort für die Aussaat der Zellen verwendet. Um ein Wiederfinden individueller Zellen zu ermöglichen, wurden CELLocate Coverslips der Fa. Eppendorf (Square size 55 µm) verwendet.

20

Mikroinjektion:

- Zur Durchführung der Mikroinjektion wurden die Petrischalen ca. 10 Minuten aus dem Brutschrank genommen. Pro Schale und Ansatz wurden ca. 50 Zellen mikroinjiziert (FemtoJet; Mikromanipulator 5171, Eppendorf). Für die Mikroinjektion wurden Glaskapillaren (FemtoTip) der Firma Eppendorf mit einem Spitzeninnendurchmesser von 0,5 µm verwendet. Die Injektionsdauer betrug 0,8 Sekunden und der Druck 30 hPa. Durchgeführt wurden die Mikroinjektionen an einem Olympus IX50 Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung. Als Injektionspuffer wurde 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7,0 verwendet, der 0,01 µg/µl pcDNA-YFP enthielt. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Mikroinjektion wurde der Injektionslösung jeweils 0,08 % (w/v) an Dextran-70000 gekoppeltes Texas-Rot (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) zugesetzt. Um die Inhibition der YFP-Expression mit spezifischer dsRNA zu untersuchen, wurden der

Injektionslösung dsRNAs zugegeben: Ansatz 1: 0,1 μ M dsRNA (Sequenzprotokoll SQ148/149); Ansatz 2: 0,1 μ M dsRNA (Sequenzprotokoll SQ148/159); Ansatz 3: ohne RNA. Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen für mindestens drei weitere
5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die intrazelluläre YFP-Fluoreszenz am Mikroskop ausgewertet: gleichzeitig rot und grün-fluoreszierende Zellen: Mikroinjektion war erfolgreich, es wird keine Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA beobachtet; bzw. es handelt sich um
10 Kontrollzellen, in die keine dsRNA injiziert wurde; nur rot-fluoreszierende Zellen: Mikroinjektion war erfolgreich, die dsRNA inhibiert YFP-Expression.

Ergebnisse:

15 Bei einer dsRNA-Konzentration von 0,1 μ M konnte beim Einsatz der dsRNA mit den an beiden 3'-Enden um je zwei Nukleotide überstehenden Einzelstrangbereichen (Sequenzprotokoll SQ148/159) eine merklich erhöhte Hemmung der Expression des YFP-Gens in Fibroblasten beobachtet werden im Vergleich zur
20 dsRNA ohne überstehende Einzelstrangenden (Tabelle 1).

Die Verwendung von kurzen, 19-25 Basenpaare enthaltenden, dsRNA-Molekülen mit Überhängen aus wenigen, vorzugsweise 1 bis 3 nicht-basengepaarten, einzelsträngigen Nukleotiden er-
25 möglicht somit eine vergleichsweise stärkere Hemmung der Genexpression in Säugerzellen als die Verwendung von dsRNAs mit derselben Anzahl von Basenpaaren ohne die entsprechenden Einzelstrangüberhänge bei jeweils gleichen RNA-Konzentrationen.

Ansatz	Name	Sequenzprotokoll-Nr.	0.1 μ M
1	S1A/ S1B	SQ148 SQ149	+
2	S1A/ S4B	SQ148 (überstehende Enden) SQ159	+++
3		ohne RNA	-

Tabelle 1: Die Symbole geben den relativen Anteil an nicht oder schwach grün-fluoreszierenden Zellen an (+++ > 90%; ++ 60-90%; + 30-60%; - < 10%).

5

II. Hemmung der Genexpression eines Zielgens in kultivierten HELA-S3-Zellen und Mausfibroblasten durch dsRNA:

- 10 Die Effektivität der Inhibition der YFP-Expression nach transienter Transfektion eines YFP-codierenden Plasmids auf der Basis der RNA-Interferenz mit dsRNAs läßt sich durch Gestaltung der 3'-Enden und der Länge des basengepaarten Bereichs modulieren.

15

Ausführungsbeispiel:

- Zum Wirksamkeitsnachweis der dsRNA bei der spezifischen Inhibition der Genexpression wurden transient transfizierte
- 20 NIH/3T3-Zellen (Fibroblasten aus NIH Swiss Mausembryo, ECCAC (European collection of animal cell culture) Nr. 93061524) und HELA-S3 (humane cervikale Karzinomzellen, DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) Nr. ACC 161) verwendet. Für die Transfektion wurde das Plasmid pcDNA-YFP
- 25 verwendet, das ein 800 bp großes Bam HI /Eco RI-YFP-Fragment in den entsprechenden Schnittstellen des Vektors pcDNA3 enthält. Aus der Sequenz des gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) abgeleitete doppelsträngige RNAs (dsRNAs) wurden herge-

stellt und zusammen mit dem Plasmid pcDNA-YFP transient in die Fibroblasten transfiziert (Die verwendeten spezifischen dsRNAs sind in ihren Antisinn-Strängen komplementär zu entsprechenden Abschnitten der Gensequenzen von sowohl YFP als auch GFP). Nach 48 Stunden wurde die Fluoreszenzabnahme quantifiziert. Als Kontrollen fungierten Zellen, die entweder nur mit pcDNA-YFP oder mit pcDNA-YFP und einer Kontroll-dsRNA (nicht aus der YFP-Sequenz abgeleitet) transfiziert wurden.

10 Versuchsprotokoll:

dsRNA-Synthese:

Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9x250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

Aussaat der Zellen:

30 Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der NIH/3T3-Zellen und der HELA-S3 erfolgte im Brutschrank (CO₂-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter

Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom), für die Mausfibroblasten, und Ham's F12 für die HELA-Zellen mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Durchführung der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/EDTA, Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von $1,0 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung in einer 96-Loch-Platte (Multiwell Schalen 96-Well Flachboden, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 150 µl Wachstumsmedium ausgesät.

15

Durchführung der transienten Transfektion:

Die Transfektion wurde mit Lipofectamine Plus™ Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Well wurden 0,15 µg pcDNA-YFP-Plasmid eingesetzt. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug 60 µl. Es wurden jeweils 3-fach-Proben angesetzt. Die Plasmid-DNA wurde zuerst zusammen mit der dsRNA komplexiert. Dazu wurde die Plasmid-DNA und die dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt und pro 0,1 µg Plasmid-DNA 1 µl PLUS Reagent eingesetzt (in einem Volumen von 10 µl) und nach dem Mischen für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde pro 0,1 µg Plasmid-DNA 0,5 µl Lipofectamine in insgesamt 10 µl serumfreiem Medium verdünnt, gut gemischt, zu dem Plasmid/dsRNA/PLUS-Gemisch zugegeben und nochmals 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit 200 µl serumfreiem Medium gewaschen und danach mit 40 µl serumfreiem Medium bis zur Zugabe von DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 20 µl DNA/dsRNA/PLUS/Lipofectamine pro

Well wurden die Zellen für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach der Inkubation 1 x mit 200 µl Wachstumsmedium gewaschen und für 24 Stunden bis zur Detektion der Fluoreszenz in 200 µl Wachstumsmedium im Brutschrank inkubiert.

Detektion der Fluoreszenz:

24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel wurde die Fluoreszenz der Zellen am Fluoreszenz-Mikroskop (IX50-S8F2, Fluoreszenz-Einheit U-ULS100Hg, Brenner U-RFL-T200, Olympus) mit einer USH-I02D-Quecksilber-Lampe (USHIO Inc., Tokyo, Japan), ausgestattet mit einem WIB-Fluoreszenz-Würfel und einer digitalen CCD-Kamera (Orca IIm, Hamamatsu) und C4742-95 Kamera-Controller) photographiert. Die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen erfolgte mit der analysis-Software 3.1 (Soft Imaging Sytem GmbH, Deutschland). Um die YFP-Fluoreszenz in Relation zur Zelldichte zu setzen, wurde eine Zellkernfärbung (Hoechst-Staining) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 100 µl Methylcarnoy (75% Methanol, 25% Eisessig) zuerst für 5 und danach nochmals für 10 Minuten in Methylcarnoy fixiert. Nach dem Lufttrocknen wurden die fixierten Zellen für 30 Minuten im Dunkeln mit 100 µl pro Well Hoechst-Farbstoff (75 ng/ml) inkubiert. Nach 2maligem Waschen mit PBS (PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , Biochrom) wurden die Hoechst-gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus, WU-Fluoreszenz-Würfel für Hoechst) photographiert.

In den Fig. 3 bis 9 sind die Ergebnisse zur Inhibition der YFP-Expression durch dsRNA in kultivierten Zellen zusammengefasst:

30

In Fig. 3, 4, 5 und 6 sind die Effekte von YFP-spezifischen dsRNAs und von Kontroll-dsRNAs auf die YFP-Expression in NIH/3T3-Mausfibroblasten nach transients Transfektion zusammengefasst. Die Experimente wurden wie im Versuchsprotokoll

beschrieben durchgeführt. Die Konzentration der dsRNA bezieht sich auf die Konzentration im Medium während der Transfektionsreaktion. Die Bezeichnungen für die dsRNAs sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz pro Bildausschnitt in Flächenprozent. Pro Well wurden 3 verschiedene Bildausschnitte ausgewertet. Die Mittelwerte ergeben sich aus den 3-fach-Ansätzen.

In den Fig. 7 und 9 ist die spezifische Inhibition der YFP-Genexpression durch dsRNAs in HELA-S3-Zellen dargestellt.

- 10 In Fig. 7 ist die hemmende Wirkung unterschiedlich gestalteter dsRNA-Konstrukte (Tabelle 2) in verschiedenen Konzentrationen auf die Expression von YFP in HeLa-Zellen dargestellt. Fig. 8 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten NIH/3T3-Maus-
- 15 fibroblasten ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).

8A: YFP-Kontrolle

8B: S1, 10 nM

8C: S4, 10 nM

- 20 8D: S7, 10 nM

8E: S7/S11, 1 nM

8F: S7/S12, 1 nM

- Fig. 9 zeigt repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transient mit YFP transfizierten HELA-3S-Zellen ohne dsRNA und mit spezifisch gegen YFP gerichteten dsRNAs (x 100 Vergrößerung).
- 25

9A: K2-Kontrolle, 10 nM

9B: S1, 10 nM

- 30 9C: S4, 10 nM

9D: S7, 10 nM

9E: S7/11, 1 nM

9F: S7/12, 1 nM

9G: S1A/S4B, 10 nM

9H: YFP-Kontrolle

Ergebnisse:

- 5 Fig. 3 zeigt, dass die YFP-Expression nach transienter
Kotransfektion von Mausfibroblasten mit dem YFP-Plasmid und
spezifisch gegen die YFP-Sequenz gerichteten dsRNAs dann be-
sonders wirkungsvoll gehemmt wird, wenn die 3'-Enden der 22
und 19 Basenpaare enthaltenden Bereiche der dsRNAs einzel-
10 strängige Abschnitte von 2 Nukleotiden (nt) aufweisen. Wäh-
rend die dsRNA S1 mit glatten 3'-Enden bei einer Konzentration
von 1 nM (bezogen auf die Konzentration im Zellkultur-
Medium während der Durchführung der Transfektion) keine inhi-
bitorischen Effekte auf die YFP-Expression zeigt, inhibieren
15 die dsRNAs S7 (19 Nukleotidpaare) und S4 (22 Nukleotidpaare)
mit jeweils 2nt Überhängen an beiden 3'-Enden die YFP-
Expression um 50 bzw. um 70% im Vergleich zu den entsprechen-
den Kontroll-dsRNAs K3 und K2. Bei einer Konzentration von 10
nM inhibiert die als S1 bezeichnete dsRNA mit glatten Enden
20 die YFP-Expression um ~65%, während die Inhibition der YFP-
Expression durch die S4 dsRNA ~93% beträgt (Fig. 4). Der in-
hibitorische Effekt der mit S4 und S7 bezeichneten dsRNAs ist
konzentrationsabhängig (Fig. 3 und 4, siehe auch Fig. 7).
- 25 Fig. 4 zeigt, dass für die effiziente Unterdrückung der YFP-
Genexpression die einzelsträngige Ausbildung nicht an beiden
3'-Enden (auf Sinn- und Antisinn-Strang) notwendig ist. Um
eine möglichst effektive Inhibition der YFP-Expression zu er-
reichen, ist lediglich der 2nt-Überhang am 3'-Ende auf dem
30 Antisinn-Strang notwendig. So liegt die Inhibition der YFP-
Expression bei einer Konzentration von 1 nM bei den beiden
dsRNAs S4 (mit 2nt-Überhängen auf beiden 3'-Enden) und
S1A/S4B (mit einem 2nt-Überhang auf dem 3'-Ende des Antisinn-
Stranges) bei ~70%. Befindet sich dagegen der 2nt-Überhang

auf dem 3'-Ende des Sinn-Stranges (und das 3'-Ende des Antisinn-Stranges trägt keinen einzelsträngigen Bereich), so liegt die Inhibition der YFP-Genexpression lediglich bei 50%. Analog ist die Inhibition bei höheren Konzentrationen deutlich besser, wenn mindestens das 3'-Ende des Antisinn-Stranges einen 2nt-Überhang trägt.

Eine deutlichere Hemmung der YFP-Expression wird erreicht, wenn der basengepaarte Bereich 21 Nukleotid-Paare statt 22 (S1 und S4), 20 (S13 bzw. S13/14) oder 19 (S7) umfasst (Fig. 5, 6 und 7). So beträgt die Inhibition der YFP-Expression durch S1 (22 Basenpaarungen mit glatten Enden) in einer Konzentration von 5 nM ~40%, während die Inhibition durch S7/S12 (21 Basenpaarungen mit glatten Enden), ebenfalls mit 5 nM bei ~92% liegt. Weist die dsRNA mit 21 Basenpaarungen noch einen 2nt-Überhang am Antisinnstrang-3'-Ende (S7/S11) auf, so liegt die Inhibition bei ~ 97% (verglichen mit ~73% Inhibition durch S4 und ~70% Inhibition durch S7).

20

III. Untersuchung der Serumstabilität der doppelsträngigen RNA (dsRNA):

Ziel ist es, die in den Zellkulturen gefundene Effektivität der durch dsRNAs vermittelten Hemmung der Genexpression von Zielgenen für den Einsatz *in vivo* zu steigern. Dies wird durch eine verbesserte Stabilität der dsRNAs im Serum und durch eine daraus resultierende verlängerte Verweilzeit des Moleküls im Kreislauf bzw. die damit verbundenen erhöhte-wirksame- Konzentration des funktionellen Moleküls erreicht.

30

Ausführungsbeispiel:

Die Serumstabilität der die GFP-Expression hemmenden dsRNAs wurde ex vivo in murinem und humanem Serum getestet.

Versuchsprotokoll:

5

Die Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum mit der entsprechenden dsRNA erfolgte bei 37°C. Es wurden je 85 µl Serum mit 15 µl 100µM dsRNA inkubiert. Nach bestimmten Inkubationszeiten (30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h) wurden die Proben
10 bei -80°C eingefroren. Als Kontrolle wurde dsRNA ohne Serum (+85 µl ddH₂O) und dsRNA mit Serum zum Zeitpunkt 0 verwendet.

Für die Isolierung der dsRNA aus dem Inkubationsansatz, die auf Eis erfolgte, wurden jeweils 400 µl 0,1% SDS zu den Ansätzen gegeben und diese einer Phenolextraktion unterzogen:
15 Pro Ansatz wurden 500 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (IAA, 25:24:1, Roti®-Phenol, Roth, Karlsruhe) zugegeben und für 30 sec auf höchster Stufe gevortext (Vortex Genie-2; Scientific Industries). Nach 10minütiger Inkubation auf Eis
20 erfolgte die Phasentrennung durch Zentrifugation bei 12.000xg, 4°C, für 10 min (Sigma 3K30, Rotor 12131-H). Die obere wässrige Phase (ca. 200 µl) wurde abgenommen und zuerst einem DNase I- und danach einem Proteinase K - Verdau unterzogen: Zugabe von 20 µl 10xfach DNaseI-Puffer (100 mM Tris,
25 pH 7,5, 25 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) und 10 U DNase I (D7291, Sigma-Aldrich), 30 min Inkubation bei 37°C, erneute Zugabe von 6 U DNase I und Inkubation für weitere 20 min bei 37°C, Zugabe von 5 µl Proteinase K (20 mg/ml, 04-1075, Peqlab, Deutschland) und 30 min Inkubation bei 37°C. Danach wurde ei-
30 ne Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde 500 µl Phenol : Chloroform : IAA (25:24:1) zugegeben, 30 sec auf höchster Stufe gevortext, 10 min bei 12.000xg, 4°C, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nacheinander mit 40 µl 3 M Na-Ac (Natriumacetat), pH 5,2, und 1 ml 100% EtOH versetzt, dazwi-

- schen gut gemischt und für mindestens 1 h bei -80°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei $12.000\times g$ für 30 min und 4°C pelletiert, mit 70% EtOH gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, $12.000\times g$, 4°C). Das luftgetrocknete
- 5 Pellet wurde in 30 μl RNA-Gelauftragspuffer (7 M Harnstoff, 1 x TBE (0,09 M Tris-Borat, 0,002 M EDTA (Ethyldiamintetraacetat), 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 0,02% (w/v) Xylencyanol) aufgenommen und bis zum Gelauftrag bei -20°C gelagert.
- 10 Zur Charakterisierung der dsRNA wurde eine analytische, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (analytische PAGE) durchgeführt. Die Harnstoffgele wurden kurz vor dem Lauf hergestellt: 7M Harnstoff (21g) wurde in 25 ml 40% wässrige Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung (Rotiphorese-Gel, A515.1,
- 15 Roth) und 5 ml 10 x TBE (108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA pro L Aqua dest.) unter Rühren gelöst und auf 50 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Kurz vor dem Gießen wurden 50 μl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und 500 μl 10% APS (Ammoniumperoxidisulfat) zugesetzt. Nach dem Auspolymerisieren
- 20 wurde das Gel in eine vertikale Elektrophorese-Apparatur (Merck, Darmstadt) eingesetzt und ein Vorlauf für 30 min bei konstant 40 mA Stromstärke durchgeführt. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE-Puffer verwendet. Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die RNA-Proben für 5 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt
- 25 und für 20 sec in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, minispin) abzentrifugiert. Es wurden je 15 μl auf das Gel aufgetragen. Der Lauf erfolgte für ca. 2h bei einem konstanten Stromfluß von 40 mA. Nach dem Lauf wurde das Gel 30 min bei RT (Raumtemperatur) mit Stains all-Färbelösung (20 ml Stains all
- 30 Stammlösung (200 mg Stains all in 200 ml Formamid gelöst) mit 200 ml Aqua dest. und 180 ml Formamid versetzt) gefärbt und die Hintergrundfärbung danach durch Spülen in Aqua dest. für 45 min entfernt. Die Gele wurden mit dem Photodokumentationssystem Image Master VDS von Pharmacia photographiert.

Die Fig. 10 bis 17 zeigen die Serumstabilität der dsRNA nach Inkubation mit humanem bzw. murinem Serum und nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung im 20%igem 7M Harnstoffgel.

5 **Fig. 10: Inkubation von S1 (0-22-0) in Maus-Serum**

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. zum Zeitpunkt 0
3. für 30 Minuten
4. für 1 Stunde
- 10 5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 12 Stunden
8. 2 μ l 100 μ M S1 ohne Inkubation
- S1A) Sinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1A)
- 15 S1B) Antisinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1B)

Fig. 11: Inkubation von S1 (0-22-0) in humanem Serum

1. 2 μ l 100 μ M S1 unbehandelt (ohne Inkubation)
2. für 30 Minuten
3. für 2 Stunden
- 20 4. für 4 Stunden
5. für 6 Stunden
6. für 8 Stunden
7. für 12 Stunden
8. für 24 Stunden
- 25 S1A) Sinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1A)
- S1B) Antisinnstrang S1 (10 μ l 20 μ M S1B)

Fig. 12: Inkubation von S7 (2-19-2) in Maus-Serum

1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
2. für 30 Minuten
- 30 3. für 4 Stunden
4. für 12 Stunden

Fig. 13: Inkubation von S7 (2-19-2) in humanem Serum

1. Sinnstrang S7 (10 μ l 20 μ M S7A)

2. Antisinnstrang S7 (10 μ l 20 μ M S7B)
 3. für 30 Minuten
 4. für 1 Stunde
 5. für 2 Stunden
 - 5 6. für 4 Stunden
 7. für 6 Stunden
 8. für 12 Stunden
 9. für 24 Stunden
 10. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
- 10 Fig. 14: Inkubation von K3 (2-19-2) in Maus-Serum
1. Sinnstrang K3 (10 μ l 20 μ M K3A)
 2. Antisinnstrang K3 (10 μ l 20 μ M K3B)
 3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
 4. zum Zeitpunkt 0 (mit Serum)
 - 15 5. für 30 Minuten
 6. für 1 Stunde
 7. für 2 Stunden
 8. für 4 Stunden
 9. für 12 Stunden
- 20 Fig. 15: Inkubation von PKC1/2 (0-22-2) in Maus-Serum
1. für 30 Minuten
 2. für 1 Stunde
 3. für 2 Stunden
 4. für 4 Stunden
 - 25 5. für 12 Stunden
 6. 2 μ l 100 μ M PKC1/2 (unbehandelt)
- Fig. 16: Inkubation von S1A/S4B (0-22-2) in humanem Serum
1. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
 2. für 24 Stunden
 - 30 3. für 12 Stunden
 4. für 8 Stunden
 5. für 6 Stunden
 6. für 4 Stunden

7. für 2 Stunden
8. für 30 Minuten
9. Sinnstrang S1A (10 μ l 20 μ M S1A)
10. Antisinnstrang S4B (10 μ l 20 μ M S4B)

5 Fig. 17: Inkubation von K2 (2-22-2) in humanem Serum

1. Sinnstrang K2 (10 μ l 20 μ M K2A)
2. Antisinnstrang K2 (10 μ l 20 μ M K2B)
3. zum Zeitpunkt 0 (ohne Serum)
4. für 30 Minuten
- 10 5. für 2 Stunden
6. für 4 Stunden
7. für 6 Stunden
8. für 8 Stunden
9. für 12 Stunden
- 15 10. für 24 Stunden

Ergebnisse:

dsRNAs ohne einzelsträngige Bereiche an den 3'-Enden sind im
20 Serum sowohl von Mensch und Maus wesentlich stabiler als
dsRNAs mit einzelsträngigen 2nt-Überhängen an den 3'-Enden
(Fig. 10 bis 14 und 17). Nach 12 bzw. 24 Stunden Inkubation
von S1 in murinem bzw. humanem Serum ist noch immer eine Ban-
de in der ursprünglichen Größe fast vollständig erhalten. Da-
25 gegen nimmt bei dsRNAs mit 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden
die Stabilität in humanem als auch im murinen Serum deutlich
ab. Bereits nach 4 Stunden Inkubation von S7 (Fig. 12 und 13)
oder K3 (Fig. 14) ist keine Bande in der Originalgröße mehr
detektierbar.

30

Um die Stabilität von dsRNA im Serum zu erhöhen, ist es aus-
reichend, wenn die dsRNA ein glattes Ende besitzt. Im Maus-
Serum ist nach 4 Stunden Inkubation (Fig. 15, Bahn 4) die

Bande in der Originalgröße kaum abgebaut im Vergleich zu S7 (nach 4 Stunden vollständiger Abbau; Fig. 12, Bahn 3).

- Als optimaler Kompromiß hinsichtlich der biologischen Wirksamkeit von dsRNA kann die Verwendung von dsRNA mit einem glattem Ende und einem einzelsträngigem Bereich von 2 Nukleotiden angesehen werden, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Antisinn-Stranges befinden sollte.
- 10 Die hier verwendeten Sequenzen sind aus der nachstehenden Tabelle 2 und den Sequenzprotokollen SQ148-151 und 153-167 ersichtlich.

Name	Sequenz- proto- koll-Nr.	dsRNA-Sequenz	
S1	SQ148 SQ149	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-0
S7	SQ150 SQ151	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUU -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUG -5'	2-19-2
K1	SQ153 SQ154	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3' (B) 3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	0-22-0
K3	SQ155 SQ156	(A) 5'-GAUGAGGAUCGUUUCGCAUGA-3' (B) 3'-UCCUACUCCUAGCAAAGCGUA-5'	2-19-2
K2	SQ157 SQ158	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3' (B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	2-22-2
S1A/ S4B	SQ148 SQ159	(A) 5'- CCACAUGAAGCAGCACGACUUC -3' (B) 3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	0-22-2

PKC 1/2	SQ160	(A)	5'- CUUCUCCGCCUCACACCGCUGCAA -3'	2-22-0
	SQ161	(B)	3'- GAAGAGGCGGAGUGUGGCGACG -5'	
S7/S12	SQ150	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGCUU -3'	0-21-0
	SQ162	(B)	3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	
S7/S11	SQ150	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGCUU -3'	0-21-2
	SQ163	(B)	3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAA -5'	
S13	SQ164	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGCU -3'	0-20-2
	SQ165	(B)	3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	
S13/14	SQ164	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGCU -3'	0-20-0
	SQ166	(B)	3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGA -5'	
S4	SQ167	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGCUUCU -3'	2-22-2
	SQ159	(B)	3'- CUGGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	
K1A/ K2B	SQ153	(A)	5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA -3'	0-22-2
	SQ158	(B)	3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	
K1B/ K2A	SQ154	(A)	5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCAUG -3'	2-22-0
	SQ157	(B)	3'- UGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	
S1B/ S4A	SQ149	(A)	5'- CCACAUGAAGCAGCAGCAGCUUCU -3'	2-22-0
	SQ167	(B)	3'- GGUGUACUUCGUCGUGCUGAAG -5'	

Tabelle 2

IV. In vivo-Studie:

5

Es wurde „GFP-Labormäusen“, die das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) in allen Proteinbiosynthese betreibenden Zellen exprimieren, doppelsträngige RNA (dsRNA), die aus der GFP-Sequenz abgeleitet wurde, bzw. unspezifische dsRNA intravenös in die Schwanzvene injiziert. Am Versuchsende wurden die Tie-

10

re getötet und die GFP-Expression in Gewebeschnitten und im Plasma analysiert.

Versuchsprotokoll:

5

Synthese der dsRNA:

Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Als Säulen wurden NucleoPac PA-100, 9x250 mm der Fa. Dionex, verwendet; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute. Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

Versuchstierhaltung und Versuchsdurchführung:

Es wurde der transgene Labormausstamm TgN(GFPU)5Nagy (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) verwendet, der GFP (mit einem beta-Aktin-Promotor und einem CMV intermediate early enhancer) in allen bisher untersuchten Zellen exprimiert (Hadjantonakis AK et al., 1993, Mech. Dev. 76: 79-90; Hadjantonakis AK et al., 1998 Nature Genetics 19: 220-222). GFP-transgene Mäuse lassen sich eindeutig anhand der Fluoreszenz (mit einer UV-Handlampe) von den entsprechenden Wildtypen (WT) unterscheiden. Für die Zucht wurde jeweils der entsprechende WT mit einem heterozygotem GFP-Typ verpaart.

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß den deutschen Tier-
schutzbestimmungen. Die Tiere wurden unter kontrollierten Um-
weltbedingungen in Gruppen von 3-5 Tieren in Typ III Makro-
lon-Käfigen der Fa. Ehret, Emmendingen, bei einer konstanten
5 Temperatur von 22°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h
gehalten. Als Sägemehleinstreu wurde Weichholzgranulat 8/15
der Fa. Altromin, Lage, verwendet. Die Tiere erhielten Lei-
tungswasser und Standardfutter Altromin 1324 pelletiert (Al-
tromin) ad libitum.

10

Für die Versuchsdurchführung wurden die heterozygoten GFP-
Tiere zu je 3 Tieren gruppenweise in Käfigen wie oben be-
schrieben gehalten. Die Injektionen der dsRNA-Lösung erfolg-
ten intravenös (i.v.) in die Schwanzvene im 12h-Turnus (zwi-
15 schen 5³⁰ und 7⁰⁰ sowie zwischen 17³⁰ und 19⁰⁰ Uhr) über 5 Tage
hinweg. Das Injektionsvolumen betrug 60 µl pro 10 g Körperge-
wicht und die Dosis betrug 2,5 mg dsRNA bzw. 50 µg pro kg
Körpergewicht. Die Einteilung in die Gruppen war wie folgt:

- 20 Gruppe A: PBS (phosphate buffered saline) je 60 µl pro
10 g Körpergewicht,
- Gruppe B: 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer unspezifi-
schen Kontroll-dsRNA (K1-Kontrolle mit glatten
25 Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nu-
kleotidpaaren),
- Gruppe C: 2,5 mg pro kg Körpergewicht einer weiteren un-
spezifischen Kontroll-dsRNA (K3-Kontrolle mit
30 2nt-Überhängen an beiden 3'-Enden und einem
Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren),
- Gruppe D: 2,5 mg pro kg Körpergewicht dsRNA (spezifisch
gegen GFP gerichtet, im weiteren als S1 be-

zeichnet, mit glatten Enden und einem Doppelstrangbereich von 22 Nukleotidpaaren),

- Gruppe E: 2,5 mg dsRNA pro kg Körpergewicht (spezifisch gegen GFP gerichtet, im Weiteren als S7 bezeichnet, mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren)
- 10 Gruppe F: 50 µg S1-dsRNA pro kg Körpergewicht (also 1/50 der Dosis der Gruppe D).

Nach der letzten Injektion von insgesamt 10 Injektionen wurden die Tiere nach 14-20h getötet und Organe und Blut wie beschrieben entnommen.

Organentnahme:

Sofort nach dem Töten der Tiere durch CO₂-Inhalation wurden Blut und verschiedene Organe entnommen (Thymus, Lunge, Herz, Milz, Magen, Darm, Pankreas, Gehirn, Niere und Leber). Die Organe wurden kurz in kaltem, sterilem PBS gespült und mit einem sterilen Skalpell zerteilt. Ein Teil wurde für immunhistochemische Färbungen in Methyl Carnoys (MC, 60% Methanol, 30% Chloroform, 10% Eisessig) für 24h fixiert, ein Teil für Gefrierschnitte und für Proteinisolierungen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert und ein weiterer, kleinerer Teil wurde für RNA-Isolierungen in RNAeasy-Protect (Qiagen) bei -80°C eingefroren. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme 30 min auf Eis gehalten, gemixt, 5 min bei 2000 rpm (Mini spin, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert (hier als Plasma bezeichnet).

Prozessieren der Biopsien:

Nach 24h Fixierung der Gewebe in MC wurden die Gewebestücke in einer aufsteigenden Alkoholreihe bei RT (Raumtemperatur) dehydriert: je 40 min 70% Methanol, 80% Methanol, 2 x 96% Methanol und 3 x 100% Isopropanol. Danach wurden die Gewebe
5 in 100% Isopropanol auf 60°C im Brutschrank erwärmt, nachfolgend für 1h in einem Isopropanol/Paraffin-Gemisch bei 60°C und 3 x für 2h in Paraffin inkubiert und sodann in Paraffin eingebettet. Für Immunperoxidase-Färbungen wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica) Gewebeschnitte von 3 µm Schnittdicke
10 angefertigt, auf Objektträger (Superfrost, Vogel) aufgezogen und für 30 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert.

Immunperoxidase-Färbung gegen GFP:

Die Schnitte wurden 3 x 5 min in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (3 x 3 min 100% Ethanol, 2 x 2 min 95% Ethanol) rehydriert und danach 20 min in 3% H₂O₂/Methanol zum Blocken endogener Peroxidasen inkubiert. Alle Inkubationsschritte wurden im Folgenden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach 3 x 3 min Waschen mit PBS wurde
20 mit dem 1. Antikörper (goat anti-GFP, sc-5384, Santa Cruz Biotechnology) 1:500 in 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (donkey anti-goat; Santa Cruz Biotechnology; 1:2000 Verdünnung) erfolgte für 30 min bei RT, danach wurde für 30 min
25 mit Avidin D Peroxidase (1:2000-Verdünnung, Vector Laboratories) inkubiert. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Schnitte 3 x 3 min in PBS gewaschen und Pufferreste mit Zellstoff von den Schnitten entfernt. Alle Antikörper wurden in 1% Rinderserumalbumin (BSA)/PBS verdünnt. Die Färbung mit
30 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde mit dem DAB Substrat Kit (Vector Laboratories) nach Herstellerangaben durchgeführt. Als nukleäre Gegenfärbung wurde Hämatoxylin III nach Gill (Merck) verwendet. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe und 3 x 5 min Xylol wurden die Schnitte mit

Entellan (Merck) eingedeckt. Die mikroskopische Auswertung der Färbung erfolgte mit dem IX50 Mikroskop von Olympus, ausgestattet mit einer CCD-Camera (Hamamatsu).

5 Proteinisolierung aus Gewebestücken:

Zu den noch gefrorenen Gewebestücken wurden jeweils 800 µl Isolierungspuffer (50 mM HEPES, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 10% Glycerol; 0,1% Tween; 1 mM DTT; 10 mM β-Glycerol-Phosphat; 1 mM NaF; 0,1 mM Na₃VO₄ mit einer Protease-Inhibitor-Tablette „Complete“ von Roche) zugegeben und
10 2 x 30 Sekunden mit einem Ultraturrax (DIAX 900, Dispergierwerkzeug 6G, Heidolph) homogenisiert, dazwischen auf Eis abgekühlt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde gemischt und für 20 Minuten bei 10.000xg, 4°C, zentrifugiert (3K30,
15 Sigma). Der Überstand wurde erneut 10 Minuten auf Eis inkubiert, gemischt und 20 Minuten bei 15.000xg, 4°C, zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford, 1976, modifiziert nach Zor & Selinger, 1996, mit dem Roti-Nanoquant-System von Roth nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Protein-Eichgerade wurde BSA
20 (bovines Serumalbumin) in Konzentrationen von 10 bis 100 µg/ml eingesetzt.

SDS-Gelelektrophorese:

25 Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 15% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke
30 gegossen: 7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 8,4, 150 µl 10% SDS, 3,3 ml Aqua bidest., 250 µl Ammoniumpersulfat (10%), 9 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1%

SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83 μ l Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630 μ l 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% Ammoniumpersulfat, 5 μ l TEMED.

5

Vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proteine mit einer entsprechenden Menge an 4fach Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min im Heizblock bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Bahn wurde die gleichen Plasma- bzw. Proteinmengen eingesetzt (je 3 μ l Plasma bzw. 25 μ g Gesamtprotein). Die Elektrophorese erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längenstandard wurde der Proteingelmarker von Bio-Rad (Kaleidoscope Prestained Standard) verwendet.

Western Blot und Immundetektion:

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² für 1,5 h. Als Transferpuffer wurde ein Tris/Glycin-Puffer eingesetzt (39 mM Glycin, 46 mM Tris, 0,1 % SDS und 20% Methanol). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig). Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurde die Blotmembran nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde je dreimal für 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschrte erfolgten in 0,1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (goat anti-GFP, sc-5384, San-

ta Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1:1000 erfolgte für 1h bei RT. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG HRP-conjugated Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) in einer Verdünnung von 1 : 10.000 inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System von Amersham nach den Angaben des Herstellers.

In den Fig. 18 bis 20 ist die Inhibition der GFP-Expression nach intravenöser Injektion von spezifisch gegen GFP gerichteter dsRNA mit Immunperoxidase-Färbungen gegen GFP an 3 µm Paraffinschnitten dargestellt. Im Versuchsverlauf wurde gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem doppelsträngigen Bereich von 22 Nukleotid-(nt)paaren ohne Überhänge an den 3'-Enden (D) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (B) sowie spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit einem 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden (E) und die entsprechende unspezifische Kontroll-dsRNA (C) im 12 Stunden-Turnus über 5 Tage hinweg appliziert. (F) erhielt 1/50 der Dosis von Gruppe D. Als weitere Kontrolle wurden Tiere ohne dsRNA-Gabe (A) bzw. WT-Tiere untersucht. Die Fig. 18 zeigt die Inhibition der GFP-Expression in Nierenschnitten, Fig. 19 in Herz- und Fig. 20 in Pankreasgewebe. In den Fig. 21 bis 23 sind Western Blot-Analysen der GFP-Expression in Plasma und Geweben dargestellt. In der Fig. 21 ist die Inhibition der GFP-Expression im Plasma, in Fig. 22 in der Niere und in Fig. 23 in Herz gezeigt. In Fig. 23 sind Gesamtproteinisolate aus verschiedenen Tieren aufgetragen. Es wurden jeweils gleiche Gesamtproteinmengen pro Bahn aufgetragen. In den Tieren, denen unspezifische Kontroll-dsRNA verabreicht wurde (Tiere der Gruppen B und C), ist die GFP-Expression gegenüber Tieren, die keinerlei dsRNA erhielten, nicht reduziert. Tiere, die spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden

beider Stränge und einen 19 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich erhielten, zeigten eine signifikant inhibierte GFP-Expression in den untersuchten Geweben (Herz, Niere, Pankreas und Blut), verglichen mit unbehandelten Tieren (Fig. 18 bis 23). Bei den Tieren der Gruppen D und F, denen spezifisch gegen GFP gerichtete dsRNA mit glatten Enden und einem 22 Nukleotidpaare umfassenden Doppelstrangbereich appliziert wurde, zeigten nur jene Tiere, die die dsRNA in einer Dosis von 50 µg/kg Körpergewicht pro Tag erhielten, eine spezifische Inhibition der GFP-Expression, die allerdings weniger deutlich ausgeprägt war als die der Tiere in Gruppe E.

Die zusammenfassende Auswertung von GFP-Inhibition in den Gewebeschnitten und im Western Blot ergibt, dass die Inhibition der GFP-Expression im Blut und in der Niere am stärksten ist (Fig. 18, 21 und 22).

V. Hemmung der Genexpression des EGF-Rezeptors mit dsRNA als therapeutischer Ansatz bei Krebsformen mit EGFR-Überexpression oder EGFR-induzierter Proliferation:

Der Epidermal Growth Factor (=EGF)-Rezeptor (=EGFR) gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen, transmembranen Proteinen mit einer intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität, die an der Kontrolle einer Reihe von zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierungen, migratorischen Prozessen oder der Zellvitalität beteiligt sind (Übersicht in: Van der Geer et al. 1994). Die Familie der EGFR besteht aus 4 Mitgliedern, EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) mit einer transmembranen Domäne, einer cysteinreichen extrazellulären Domäne und einer intrazellulären katalytischen Domäne. Die Sequenz des EGFR, einem 170 kDa Protein, ist seit 1984 bekannt (Ullrich et al., 1984).

Aktiviert wird der EGFR durch Peptid-Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF α (transforming growth factor), Amphiregulin, Beta-cellulin, HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) und Neureguline. Ligandenbindung induziert die Bildung von Homo- oder Heterodimeren mit nachfolgender Autophosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosine (Ullrich & Schlessinger, 1990; Alroy & Yarden, 1997). Die phosphorylierten Aminosäuren bilden die Bindungsstellen für eine Vielzahl von Proteinen, die an den proximalen Schritten der Signalweiterleitung in einem komplexen Netzwerk beteiligt sind. Der EGFR ist an den verschiedensten Tumorerkrankungen beteiligt und damit ein geeignetes Target für therapeutische Ansätze (Huang & Harari, 1999). Die Mechanismen, die zu einer aberranten EGFR-Aktivierung führen, können auf Überexpression, Amplifikation, konstitutiver Aktivierung mutanter Rezeptor-Formen oder autokrinen Loops beruhen (Voldborg et al., 1997). Eine Überexpression des EGFR wurde für eine Reihe von Tumoren beschrieben, wie z.B. Brustkrebs (Walker & Dearing, 1999), Nicht-Klein-Lungenkarzinom (Fontanini et al., 1998), Pankreaskarzinom, Kolonkarzinom (Salomon et al., 1995) und Glioblastomen (Rieske et al., 1998). Insbesondere für maligne Glioblastome sind bisher keine effizienten und spezifischen Therapeutika verfügbar.

25 Ausführungsbeispiel:

Zum Nachweis der Wirksamkeit der dsRNA bei der spezifischen Inhibition der EGFR-Genexpression wurden U-87 MG-Zellen (humane Glioblastomzellen), ECCAC (European collection of animal cell culture) Nr. 89081402, verwendet, die mit spezifisch gegen den EGF-Rezeptor (Sequenzprotokoll SQ 51) gerichteten dsRNA transfiziert wurden. Nach ca. 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, Protein isoliert und im Western Blot Verfahren die EGFR-Expression untersucht.

Versuchsprotokoll:dsRNA-Synthese:

- 5 Mittels eines RNA-Synthesizers (Typ Expedite 8909, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und herkömmlicher chemischer Verfahren wurden die aus den Sequenzprotokollen ersichtlichen RNA-Einzelstränge und die zu ihnen komplementären Einzelstränge synthetisiert. Anschließend erfolgte die Reinigung der rohen Syntheseprodukte mit Hilfe der HPLC. Verwendet wurde die Säule NucleoPac PA-100, 9x250 mm, der Fa. Dionex; als Niedersalz-Puffer 20 mM Tris, 10 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril und als Hochsalz-Puffer 20 mM Tris, 400 mM NaClO₄, pH 6,8, 10% Acetonitril. Der Fluß betrug 3 ml/Minute.
- 10
- 15 Die Hybridisierung der Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte durch Erhitzen des stöchiometrischen Gemischs der Einzelstränge in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,8, 100 mM NaCl, auf 80-90°C und nachfolgendes langsames Abkühlen über 6 Stunden auf Raumtemperatur.

20

Aussaat der Zellen:

- Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer entsprechenden Werkbank (HS18, Hera Safe, Kendro, Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung der U-87 MG-Zellen erfolgte im Brutschrank (CO₂-Inkubator T20, Hera cell, Kendro, Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Biochrom) mit 10% FCS (fetal calf serum, Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom), 1 mM Natrium-Pyruvat (Biochrom), 1xNEAA (Non-essential Aminoacids, Biochrom) und Penicillin/Streptomycin (100 IE/100 µg/ml, Biochrom). Um die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten, wurden die Zellen alle 3 Tage passagiert. 24 Stunden vor der Applikation der dsRNA mittels Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (10x Trypsin/EDTA,
- 25
- 30

Biochrom, Deutschland) und mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen/Vertiefung in einer 6-Well-Platte (6-Well Schalen, Labor Schubert & Weiss GmbH) in 1,5 ml Wachstumsmedium ausgesetzt.

5

Applikation der dsRNA in kultivierte U-87 MG-Zellen:

Die Applikation der dsRNA erfolgte mittels Transfektion mit dem OLIGOFECTAMINE™ Reagent (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers. Das Gesamt-Transfektionsvolumen betrug 10 1 ml. Zuerst wurde die dsRNA in serumfreiem Medium verdünnt: Dazu wurden pro Well 0,5 µl einer 20 µM Stammlösung spezifisch gegen EGFR gerichteten dsRNA und 9,5 µl einer 20 µM Stammlösung unspezifischer dsRNA (K1A/K2B) mit 175 µl serumfreiem Medium verdünnt (200 nM dsRNA im Transfektionsansatz 15 bzw. 10 nM spezifische EGFR-dsRNA). Das OLIGOFECTAMINE™ Reagent wurde ebenfalls in serumfreien Medium verdünnt: pro Well 3 µl mit 12 µl Medium und danach 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das verdünnte OLIGOFECTAMINE™ Reagent zu den in Medium verdünnten dsRNAs gegeben, gemischt und für 20 weitere 20 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen wurden dazu 1 x mit 1 ml serumfreiem Medium gewaschen und mit 800 µl serumfreiem Medium bis zur Zugabe von dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ Reagent weiter im Brutschrank inkubiert. Nach der Zugabe von 200 µl 25 dsRNA/OLIGOFECTAMINE™ Reagent pro Well wurden die Zellen bis zur Proteinisolierung weiter im Brutschrank inkubiert.

Proteinisolierung:

Ca. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und eine Proteinisolierung durchgeführt. Dazu wurde das 30 Medium abgenommen und das Zellmonolayer 1 x mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 200 µl Proteinisolierungspuffer (1x Protease-Inhibitor „Complete“, Roche, 50 mM HEPES, pH 7,5,

150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 10% Glyzerin, 0,1% Tween-20, 1 mM DTT, 10 mM β -Glycerinphosphat, 1 mM NaF, 0,1 mM Na_3VO_4) wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, 10 min auf Eis inkubiert, in ein Eppendorf-
5 Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C für mindestens 30 min gelagert. Nach dem Auftauen wurde das Lysat für 10 sec mit einem Dispergierer (DIAX 900, Dispergierwerkzeug 6G, Hei-dolph-Instruments GmbH & Co KG, Schwabach) auf Stufe 3 homogenisiert, für 10 min auf Eis inkubiert und für 15 min bei
10 14.000xg, 4°C (3K30, Sigma) zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford mit dem Roti®-Nanoquant-System von Roth (Roth GmbH & Co., Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden je 200 μl Proteinlösung in geeigneter Verdünnung mit 800 μl 1x Arbeits-
15 lösung gemischt und die Extinktion in Halbmikroküvetten bei 450 und 590 nm gegen Aqua dest. in einem Beckman-Spektralphotometer (DU 250) gemessen. Für die Eichgerade wurden entsprechende BSA-Verdünnungen verwendet (perliertes BSA, Sigma).

20

SDS-Gelelektrophorese:

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Multigel-Long Elektrophoresekammer von Biometra mit einer denaturierenden, diskontinuierlichen 7,5% SDS-PAGE (Polyacrylamid Gelelektrophorese) nach Lämmli (Nature 277: 680-685, 19970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel mit 1,5 mm Dicke gegossen: 3,75 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%, 0,9%), 3,8 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,4, 150 μl 10% SDS, 7,15 ml Aqua bi-dest., 150 μl Ammoniumpersulfat (10%), 9 μl TEMED (N,N,N',N'-
30 Tetramethylethylendiamin) und bis zum Auspolymerisieren mit 0,1% SDS überschichtet. Danach wurde das Sammelgel gegossen: 0,83 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,9%), 630 μl 1 M Tris/HCl, pH 6,8, 3,4 ml Aqua bidest., 50 μl 10% SDS, 50 μl 10% Ammoniumpersulfat, 5 μl TEMED.

Für den Auftrag auf das Gel wurden die Proteinproben 1:3 mit 4x Probenpuffer (200 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 100 mM DTT (Dithiotreitol), 0,02% Bromphenolblau, 20% Glycerin) versetzt, für 5 min bei 100°C denaturiert, nach dem Abkühlen auf Eis kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Pro Bahn wurden 35 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der Gelauf erfolgte wassergekühlt bei RT und konstant 50 V. Als Längensstandard wurde der Kaleidoskop-Proteingelmarker (BioRad) verwendet.

Western Blot und Immundetektion:

Der Transfer der Proteine vom SDS-PAGE auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Hybond-P, Amersham) erfolgte im semidry Verfahren nach Kyhse-Anderson (J. Biochem. Biophys. Methods 10: 203-210, 1984) bei RT und einer konstanten Stromstärke von 0,5 mA/cm² für 1,5 h. Als Transferpuffer wurden verwendet: Kathodenpuffer (30 mM Tris, 40 mM Glycin, 10% Methanol, 0,01% SDS; pH 9,4), Anodenpuffer I (300 mM Tris, pH 10,4, 10% Methanol) und Anodenpuffer II (30 mM Tris, pH 10,4, 10% Methanol). Vor dem Zusammensetzen des Blotstapels mit 3MM Whatman-Papier (Schleicher & Schüll) wurden das Gel in Kathodenpuffer und die PVDF-Membran (zuvor 30 sec in 100% Methanol) in Anodenpuffer II inkubiert (5 min): 2 Lagen 3MM-Papier (Anodenpuffer I), 1 Lage 3MM-Papier (Anodenpuffer II), PVDF-Membran, Gel, 3 Lagen 3MM-Papier (Kathodenpuffer). Zum Überprüfen des elektrophoretischen Transfers wurden sowohl die Gele nach dem Blotten als auch die Blotmembranen nach der Immundetektion mit Coomassie gefärbt (0,1% Coomassie G250, 45% Methanol, 10% Eisessig).

Die Blotmembran wurde nach dem Transfer in 1% Magermilchpulver/PBS/0,1% Tween-20 für 1h bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal für 3 min mit 0,1% Tween-20/PBS gewaschen. Alle nach-

folgenden Antikörperinkubationen und Waschschritte erfolgten in 0,1% Tween-20/ PBS. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (human EGFR extracellular domain, specific goat IgG, Cat-Nr. AF231, R&D Systems) erfolgte auf einem Schüttler für 2h

5 bei RT in einer Konzentration von 1,5 µg/ml. Danach wurde 3 x 5 min gewaschen und für 1h bei RT mit dem Sekundärantikörper (donkey anti-goat IgG Horseradish Peroxidase gelabelt, Santa Cruz Biotechnology) inkubiert (1:10.000 verdünnt). Nach dem Waschen (3 x 3min in PBS/0,1% Tween-20) erfolgte sofort die

10 Detektion mittels ECL-Reaktion (enhanced chemiluminescence): Zu 18 ml Aqua dest. wurden 200 µl Lösung A (250 mM Luminol, Roth, gelöst in DMSO), 89 µl Lösung B (90 mM p-Coumarinsäure, Sigma, gelöst in DMSO) und 2 ml 30% H₂O₂-Lösung pipettiert. Je nach Membrangröße wurden 4-6 ml direkt auf die Membran pi-

15 pettiert, 1 min bei RT inkubiert und danach sofort ein Röntgenfilm (Biomax MS, Kodak) aufgelegt.

Die hier verwendeten Sequenzen sind in der nachstehenden Tabelle 3 sowie in den Sequenzprotokollen SQ153, 157, 158, 168-

20 173 wiedergegeben.

ES-7	SQ168	(A) 5'- AACACCGCAGCAUGUCAAGAU -3'	2-19-2
	SQ169	(B) 3'- UUUUGUGGCGUCGUACAGUUC -5'	
ES-8	SQ170	(A) 5'- AAGUUAAAAUCCCGUCGCUAU -3'	2⁵-19-2⁵
	SQ171	(B) 3'- CAAUUUUUAAGGGCAGCGAUAGU -5'	
ES2A/ ES5B	SQ172	(A) 5'- AGUGUGAUCCAAGCUGUCCCAA -3'	0-22-2
	SQ173	(B) 3'- UUUCACACUAGGUUCGACAGGGUU -5'	
K2	SQ157	(A) 5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUUCGAUG -3'	2-22-2
	SQ158	(B) 3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU -5'	

K1A/ K2B	SQ153	(A)	5'- ACAGGAUGAGGAUCGUUUCGCA	-3'	0-22-2
	SQ158	(B)	3'- UCUGUCCUACUCCUAGCAAAGCGU	-5'	

Tabelle 3

Inhibition der EGFR-Expression in U-87 MG Glioblastom-Zellen:

- 5 24 Stunden nach dem Aussäen der Zellen wurden diese mit 10 nM dsRNA wie angegeben (Oligofectamine) transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet und Protein isoliert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im 7,5% SDS-PAGE. Pro Bahn wurden je 35 µg Gesamtprotein aufgetragen. In Fig. 24 ist die
- 10 entsprechende Western Blot-Analyse gezeigt, aus der hervorgeht, dass sich mit der spezifisch gegen das EGFR-Gen gerichteten dsRNA mit einem 2nt-Überhang am 3'-Ende des Antisinn-Strangs die EGFR-Expression nach Transfektion in U-87 MG-Zellen signifikant gegenüber den entsprechenden Kontrollen
- 15 inhibieren lässt. Diese Inhibition der Expression eines endogenen Gens durch spezifische dsRNA bestätigt somit die in Ausführungsbeispiel II angeführten Ergebnisse zur Inhibition der Expression eines nach transienter Transfektion in die Zelle eingebrachten artifiziellen Gens. Die durch ES-7 bzw.
- 20 ES-8 vermittelte Inhibition der EGFR-Expression ist deutlich geringer. Die in Fig. 24 verwendeten dsRNAs sind Tabelle 3 zu entnehmen.

25 VI. Hemmung der Expression des Multidrug resistance Gens 1 (MDR1):

Versuchsprotokoll:

- Der *in vitro* Nachweis für das Blockieren der MDR1-Expression wurde in der Kolonkarzinom-Zelllinie LS174T (ATCC - American
- 30 Type Culture Collection; Tom et al., 1976) durchgeführt. Von

dieser Zelllinie ist bekannt, daß die Expression von MDR1 durch Zugabe von Rifampicin zum Kulturmedium induzierbar ist (Geick et al., 2001). Transfektionen wurden mit verschiedenen käuflichen Transfektions-Kits (Lipofectamine, Oligofectamine, beide Invitrogen; TransMessenger, Qiagen) durchgeführt, wobei der TransMessenger Transfektions-Kit sich als für diese Zelllinie am geeignetsten herausstellte.

Zur Durchführung der RNA-Interferenz-Experimente wurden 4 kurze doppelsträngige Ribonukleinsäuren R1-R4 eingesetzt, deren Sequenzen in Tabelle 4) gezeigt sind. Die Ribonukleinsäuren sind mit Abschnitten der kodierenden Sequenz von MDR1 (Sequenzprotokoll SQ 30) homolog. Die Sequenzen R1 - R3 bestehen aus einem 22-mer Sinn- und einem 24-mer Antisinn-Strang, wobei der entstehende Doppelstrang am 3'-Ende des Antisinn-Stranges einen 2-Nukleotid-Überhang aufweist (0-22-2). Die Sequenz R4 entspricht R1, jedoch besteht sie aus einem 19-mer Doppelstrang mit je 2-Nukleotid-Überhängen an jedem 3'-Ende (2-19-2).

<u>Name</u>	<u>Sequenz- proto- koll-Nr.</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Position in Daten- bank-# AF016535</u>
Seq R1	SQ141 SQ142	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG A-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA UUC U-5'	1320-1342 1335-1318
Seq R2	SQ143 SQ152	5' - UAU AGG UUC CAG GCU UGC UGU A-3' 3' -CG AUA UCC AAG GUC CGA ACG ACA U-5'	2599-2621 2621-2597
Seq R3	SQ144 SQ145	5' - CCA GAG AAG GCC GCA CCU GCA U-3' 3' -UC GGU CUC UUC CGG CGU GGA CGU A-5'	3778-3799 3799-3776
Seq R4	SQ146 SQ147	5' - CCA UCU CGA AAA GAA GUU AAG-3' 3' -UG GGU AGA GCU UUU CUU CAA U -5'	1320-1341 1339-1318

			<u>Position in</u> <u>Daten-</u> <u>bank-#</u> <u>AF402779</u>
K1A/	SQ153	5'- ACA GGA UGA GGA UCG UUU CGC A-3'	2829-2808
K2B	SQ158	3'-UC UGU CCU ACU CCU AGC AAA GCG U-5'	2808-2831

Tabelle 4

Die in Tabelle 4 gezeigten Sequenzen sind nochmals im Sequenzprotokoll als Sequenzen SQ141-147, 152, 153, 158 wiedergegeben. Die dsRNAs wurden in einer Konzentration von 175 nM jeweils als doppelte Ansätze in die Zellen transfiziert, welche am Tag zuvor in 12-Loch-Platten à 3,8 x 10⁵ Zellen/Vertiefung ausgesät wurden. Dazu wurden pro Transfektionsansatz 93,3 µl EC-R-Puffer (TransMessenger Kit, Qiagen, Hilden) mit 3,2 µl Enhancer-R vermengt und danach 3,5 µl der jeweiligen 20 µM dsRNA zugegeben, gut gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von jeweils 6 µl TransMessenger Transfection Reagent wurden die Transfektionsansätze 10 Sekunden kräftig gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, einmal mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen und 200 µl frisches Medium ohne FCS pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der 10-minütigen Inkubationszeit wurden je 100 µl FCS-freies Medium zu den Transfektionsansätzen pipettiert, gemischt, und die Mischung tropfenweise zu den Zellen pipettiert (die dsRNA-Konzentration von 175 µM bezieht sich auf 400 µl Medium Gesamtvolumen). Die dsRNA/Trans-Messenger-Komplexe wurden 4 Stunden bei 37°C mit den Zellen in FCS-freiem Medium inkubiert. Danach wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wobei das frische Medium 10 µM Rifampicin und 10% FCS enthält. Als

Kontrolle wurde eine unspezifische dsRNA-Sequenz, die keinerlei Homologie mit der MDR1-Gensequenz aufweist, eingesetzt (K) und eine MOCK-Transfektion durchgeführt, die alle Reagenzien außer dsRNA enthielt.

5

Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 Stunden geerntet und die Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Mini-Kit von Qiagen extrahiert. 10 µg Gesamt-RNA jeder Probe wurden auf einem 1%igen Agarose-Formaldehyd-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran gebロットet und mit 5'-α³²P-dCTP random-markierten, spezifischen Sonden zuerst gegen MDR1 und nach dem Strippen des Blots gegen GAPDH als interne Kontrolle hybridisiert und auf Röntgenfilmen exponiert.

15 Die Röntgenfilme wurden digitalisiert (Image Master, VDS Pharmacia) und mit der Image-Quant-Software quantifiziert. Dabei wurde ein Abgleich der MDR1-spezifischen Banden mit den entsprechenden GAPDH-Banden durchgeführt.

20 Ergebnisse:

Die Fig. 25 und 26 zeigen Northern-Blots (Fig. 25a, 26a) mit quantitativer Auswertung der MDR1-spezifischen Banden nach Abgleich mit den entsprechenden GAPDH-Werten (Fig. 25b, 26b). Es konnte eine Reduktion der MDR1-mRNA um bis zu 55 % im Vergleich zur MOCK-Transfektion und um bis zu 45 % im Vergleich zur unspezifischen Kontroll-Transfektion beobachtet werden. Nach 48 h ist eine signifikante Reduktion des MDR1-mRNA-Niveaus mit den als R1, R2, R3 (Tabelle 4) bezeichneten dsRNA-Konstrukten erreicht worden. Mit den R4-dsRNA-Konstrukten wurde nach 48 h keine signifikante Reduktion gegenüber den Kontrollen beobachtet (Fig. 26a und 26b). Nach 74 h war eine deutlich stärkere Reduktion des MDR1-mRNA-Levels mit R1, R2 und R3 gegenüber den Kontrollen im Vergleich zu den 48 h-Werten zu beobachten (Fig. 25a und 25b).

- Mit R4 konnte zu diesem Zeitpunkt ebenfalls eine signifikante Verringerung des MDR1-mRNA-Niveaus erzielt werden. Somit reduzieren die Konstrukte mit einem 2nt-Überhang am 3'-Ende des Antisinnstrangs und einem doppelsträngigen Bereich aus 22 Nukleotidpaaren, relativ unabhängig von dem jeweiligen zum MDR1-Gen homologen Sequenzbereich (nach 48 h; Fig. 26b) das MDR1-mRNA-Level effizienter als die Konstrukte mit mit 2nt-Überhängen an den 3'-Enden beider Stränge (Antisinn- und Sinnstrang) und einem Doppelstrangbereich von 19 Nukleotidpaaren. Die Ergebnisse bekräftigen damit die in Ausführungsbeispiel IV beschriebene Inhibition der EGFR-Genexpression durch spezifische dsRNAs nach Transfektion in U-87 MG-Zellen.
- Die Transfektionseffizienz wurde in einem getrennten Experiment mit Hilfe eines Texas-Red-markierten DNA-Oligonukleotids (TexRed-A(GATC)₅T; ebenfalls 175 nM transfiziert) ermittelt (Fig. 27a, 27b; 400fache Vergrößerung, 48h nach Transfektion). Sie betrug etwa 50% auf der Grundlage der rot fluoreszierenden Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl. Berücksichtigt man die Transfektionsrate der Zellen von etwa 50%, so legt die beobachtete Verringerung des MDR1-mRNA-Niveaus um ca. 45-55% liegt (verglichen mit den Kontrollen), den Schluss nahe, dass in allen Zellen, die mit spezifischer dsRNA erfolgreich transfiziert werden konnten, die MDR1-mRNA nahezu vollständig und spezifisch abgebaut wurde.

Literatur:

- Alroy I & Yarden Y (1997): The Erb signalling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Letters 410: 83-86.
- Bass,B.L., 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell 101, 235-238.
- Bosher,J.M. and Labouesse,M., 2000. RNA interference: genetic wand and genetic watchdog. Nature Cell Biology 2, E31-E36.
- Bradford MM (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Caplen,N.J., Fleenor,J., Fire,A., and Morgan,R.A., 2000. dsRNA-mediated gene silencing in cultured *Drosophila* cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference. Gene 252, 95-105.
- Clemens,J.C., Worby,C.A., Simonson-Leff,N., Muda,M., Maelhama,T., Hemmings,B.A., and Dixon,J.E., 2000. Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97, 6499-6503.
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Liebermann G & Slamon DJ (1999): Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that

has progressed after chemotherapy for metastatic disease.
Journal of Clinical Oncology 17: 2639-2648.

Ding, S.W., 2000. RNA silencing. Curr. Opin. Biotechnol. 11,
5 152-156.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E.,
and Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference
by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature
10 391, 806-811.

Fire, A., 1999. RNA-triggered gene silencing. Trends Genet.
15, 358-363.

15 Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruth-
ers, M.H., Neilson, T., and Turner, D.H., 1986. Improved free-
energy parameters for prediction of RNA duplex stability.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9373-9377 .

20 Geick, A., Eichelbaum, M., Burk, O. (2001). Nuclear receptor
response elements mediate induction of intestinal MDR1 by ri-
fampin. J. Biol. Chem. 276 (18), 14581-14587.

Fontanini G, De Laurentiis M, Vignati S, Chine S, Lucchi M,
25 Silvestri V, Mussi A, De Placido S, Tortora G, Bianco AR,
Gullick W, Angeletti CA, Bevilacqua G & Ciardiello F (1998):
Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors
and receptors and of neoangiogenesis in completely resected
stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and mi-
30 crovessel count are independent prognostic factors of sur-
vival. Clinical Cancer Research 4: 241-249.

- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J., 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
- 5 Higgins, C.F. (1995). The ABC of channel regulation. *Cell*, 82, 693-696.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1993): Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech. Dev.* 76: 79-90.
- 10 Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M & Nagy A (1998): Non-invasive sexing of preimplantation mammalian embryos. *Nature Genetics* 19: 220-222.
- 15 Kyhse-Anderson J (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10: 203-210.
- 20 Lämmlé UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- 25 Loo, T.W., and Clarke, D.M. (1999) *Biochem. Cell Biol.* 77, 11-23.
- Huang SM & Harari PM (1999): Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Investigational New Drugs* 17: 259-269.
- 30 Limmer, S., Hofmann, H.-P., Ott, G., and Sprinzl, M., 1993. The 3'-terminal end (NCCA) of tRNA determines the structure and

stability of the aminoacyl acceptor stem. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 , 6199-6202.

5 Montgomery, M.K. and Fire, A., 1998. Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. Trends Genet. 14, 255-258.

10 Montgomery, M.K., Xu, S., and Fire, A., 1998. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 15502-15507.

15 Rieske P, Kordek R, Bartkowiak J, Debiec-Rychter M, Bienhat W & Liberski PP (1998): A comparative study of epidermal growth factor (EGFR) and mdm2 gene amplification and protein immunoreactivity in human glioblastomas. Polish Journal of Pathology 49: 145-149.

20 Robert, J. (1999). Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches. Europ J Clin Invest 29, 536-545.

25 Stavrovskaya, A.A. (2000) Biochemistry (Moscow) 65 (1), 95-106.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F & Normanno N (1995): Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies: Critical Reviews in Oncology and Haematology 19: 183-232.

30 Tom, B.H., Rutzky, L.P., Jakstys, M.M., Oyasu, R., Kaye, C.I., Kahan, B.D. (1976), In vitro, 12, 180-191.

Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y. (1981). Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res*, 41, 1967-72.

5

Ui-Tei, K., Zenno, S., Miyata, Y., and Saigo, K., 2000. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett.* 479, 79-82.

10

Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Liebermann TA, Schlessinger J et al. (1984): Human epidermal growth factor receptor cDNA sequences and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425.

15

Ullrich A & Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61: 203-212.

20 Van der Geer P, Hunter T & Linberg RA (1994): Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annual review in *Cell Biology* 10: 251-337.

Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M & Poulsen HS (1997): Epidermal growth factor Receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology* 8: 1197-1206.

Walker RA & Dearing SJ (1999): Expression of epidermal growth factor receptor mRNA and protein in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Research Treatment* 53: 167-176.

30

Zamore,P.D., Tuschl,T., Sharp,P.A., and Bartel,D.P., 2000.
RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage
of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101 , 25-33.

- 5 Zor T & Selinger Z (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. Anal. Biochem. 236: 302-308.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte:

5

Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

10 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

15

und wobei die dsRNA zumindest an einem Ende (E1, E2) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

20 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

25 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
zumindest eine entsprechend der dsRNA I nach einem der vorher-
gehenden Ansprüche ausgebildete weitere doppelsträngige
Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird,
5 wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten
Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei ein weiterer Strang
(as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2)
der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des
10 Zielgens ist.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als
25, vorzugsweis 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleo-
15 tidpaaren aufweist/en.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise
überlappen oder aneinander grenzen.

20

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-
standet sind.

25 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,
30 Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Priongen, Gene von Angiogenese
induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von
Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an meta-
stasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Ge-

ne von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Molekülen.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 das Zielgen das MDR1-Gens ist.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus
zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnse-
10 quenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen
SQ141 - 173 verwendet wird.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt
15 wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmo-
dien, exprimiert wird.

20 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

17. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus ein humanpa-
25 thogenes Virus oder Viroid ist.

18. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus oder Viroid
ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

30 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substitu-
iert sind.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA I/II modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5

21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht wird.

10

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

15

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

20

24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

25

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

30

26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

5 28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
10

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-
15 Gruppen gebildet wird.

30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
20

31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.

25 32. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.

30 33. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

34. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 5 35. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 10 36. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
37. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
15 die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
38. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm
20 Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.
39. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen
25 men ist.
40. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.
30
41. Verwendung einer die doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle,

wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

10

42. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

15 43. Verwendung nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

44. Verwendung nach Anspruch 43, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

20

45. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

25 46. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 41 bis 45 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen
30 Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Sinn-Strangs des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

47. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

49. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 48, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstan-det sind.

50. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

51. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierenden Molekülen.

52. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 51, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

53. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

54. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 53, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.
- 5 55. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 54, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
56. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 55, wobei das
10 Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
57. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 15 58. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
59. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 58, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert
20 sind.
60. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 59, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
25
61. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 60, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische
30 Verknüpfung erhöht wird.
62. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 61, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwir-

kungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

5 63. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 62, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

10 64. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 63, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

15 65. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 64, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

20 66. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 65, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

67. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 66, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

25 68. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 67, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

30 69. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 68, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.

70. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
- 5 71. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 70, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
- 10 72. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 71, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.
- 15 73. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 72, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
74. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 73, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-
- 20 Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
75. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 74, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 25 76. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 75, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 30 77. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 76, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

78. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 77, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

5

79. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 78, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

10 80. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 79, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.

15 81. Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

20 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist,

und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
25 einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

30

82. Medikament nach Anspruch 81, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

83. Medikament nach Anspruch 81 oder 82, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

84. Medikament nach Anspruch 83, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

85. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 84, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

10

86. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 85, enthaltend zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 81 bis 85 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II), wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

15

87. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 86, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

20

88. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 87, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

25

89. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 88, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

30

90. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,

Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierende Molekülen.

91. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 90, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

10

92. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 91, wobei als dsRNA eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

15

93. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 92, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

94. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 93, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

95. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 94, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

25

96. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

97. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

30

	gcccgtgaggg	actggatggg	ctgcccacg	ggaggccggc	cggatgaggg	gactgaggag	1560
	gagacggagg	tgatcatcat	tgaggtggac	gaggaggggc	gcggggcggt	gagcggcgct	1620
	gcggtgggtg	tgcccggtgt	gctgctgtct	ctgggtgtgt	cggtgggcct	tgacgtcttc	1680
	ttcttcagac	gcccagggac	ccccagggca	ctgctctact	gccagcggtc	cctgtgggac	1740
5	aaggtctga						1749
	<210>	79					
	<211>	744					
10	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	FGF1					
15	<310>	XM003647					
	<400>	79					
	atggccgcgg	ccatcgctag	cggcttgatc	gcgcagaaac	ggcaggcgcg	ggagcagcac	60
	tgggaccggc	cgtctgccc	caggaggcg	agcagcccca	gcaagaaccc	cggtctctgc	120
20	aacggcaaac	tggtggatat	ctctccaaa	gtgcgcacat	tcggcctcaa	gaagcgcagc	180
	ttggcgccgc	aagatcccca	gctcaagggt	atagtgcaca	tcggctatatt	caggcaaggc	240
	tactacttgc	aaatgcaccc	cgtatggagc	ctcgatggaa	ccaaggatga	cagcactaat	300
	tctacactct	tcaacctcat	accagtgagg	ctacgtgttg	ttgccatcca	gggagtgtaaa	360
	acagggttgt	atatagccat	gaatggagaa	ggttacctct	accocataga	actttttacc	420
25	cctgaatgca	agttttaaaga	atctgttttt	gaaaattatt	atgtaatcta	ctcatccatg	480
	tgtacagac	aacaggaatc	tggtagagcc	tggtttttgg	gatataataa	ggaagggtcaa	540
	gctatgaag	ggaacagagt	aaagaaaacc	aaaccagcag	ctcattttct	accgaagcca	600
	ttggaaattg	ccatgtaccg	agaacctctc	ttgcatgatg	ttggggaaac	ggtcccgaa	660
	cctggggtga	gcgcaagtaa	aagcaccaag	gcgtctgcaa	taatgaatgg	aggcaaaacca	720
30	gtcaacaaga	gtaagacaac	atag				744
	<210>	80					
	<211>	468					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	FGF2					
40	<310>	NM002006					
	<400>	80					
	atggcagccg	ggagcatcac	cacgtgtccc	gccttgcccg	aggatggcgg	cagcggcgcc	60
	ttcccgcgcc	gccacttcaa	ggaccocaa	cggtgtgtact	gcacaaacgg	gggtctcttc	120
45	ctgcgcacac	accocgacgg	ccgagtgac	gggttcgggg	agaagagcga	ccctcacatc	180
	aagctacaac	ttcaagcaga	agagagagga	gttgtgtcta	tcaaggaggt	gtgtgctaac	240
	cggtacctgg	ctatgaagga	agatggaaga	ttaactggctt	ctaaatgtgt	tacggatgag	300
	tggtttcttt	ttgaacgatt	ggaatcta	aactacaata	cttacgggtc	aaggaaatac	360
	accagtttgt	atgtggcact	gaaacgaact	gggcagtata	aacttggtac	caaaacagga	420
50	cctgggcaga	aagctatact	ttttcttcca	atgtctgtcta	agagctga		468
	<210>	81					
	<211>	756					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	FGF23					
60	<310>	NM020638					
	<400>	81					

	gggggtcctgc	tctgggagat	cttcaocgtg	gggggtccc	cgtaccccg	catccctgtg	2100
	gaggagctct	tcaagctgct	gaaggagggc	caccgcatgg	acaagcccg	caactgcaca	2160
	cacgacctgt	acatgcatat	gcgggagtgc	tgccatgcgc	cgccctcca	gaggccacc	2220
	ttcaagcagc	tgggtggagga	cctggaccgt	gtccttacgc	tgacgtccac	cgacaggtac	2280
5	ctggacctgt	cgggcgcttt	cgagcagtac	tccccgggtg	gccaggacac	ccccagctcc	2340
	agctcctcag	gggacgaetc	cgtgttttgc	cacgacctgc	tgcccccggc	ccccccagc	2400
	agtgggggct	cgcggacgtg	a				2421
10	<210>	87					
	<211>	2102					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
15	<300>						
	<302>	HGF					
	<310>	B08541					
	<400>	87					
20	atgcagaggg	acaaaggaaa	agaagaaata	caattcatga	attcaaaaaa	tcagcaaaaga	60
	ctacccctaag	caaaatagat	ccagcactga	agataaaaaa	caaaaaagtg	aataactgcag	120
	acccaatgtgc	taatatagatg	actaggaata	aaggactctcc	attcactctgc	aaggcttttg	180
	tttttgataa	agcaagaaaa	caatgctctc	gggtcccccct	caatagcatg	tcaagtggag	240
	tgaaaaaaag	attttggocat	gaatttgacc	tctatgaaaa	caaagactac	ataganaact	300
25	gcatacttgg	taaaaggatg	agctacaagg	gaacagtatc	tatacctaag	agtggcatca	360
	aatgtcacgcc	ctggagttcc	atgataccac	acgaacacag	ctttttgtct	tcgagctatc	420
	ggggtaaaaga	cctacaggaa	aactactgtc	gaaatcctcg	aggggaagaa	gggggacctc	480
	ggtgtttcac	aagcaatcca	gaggtacgct	acgaagtctg	tgacattctc	cagttgttcag	540
	aagtgtgaatg	catgactctg	aatggggaga	gtttatcgagg	tctcatggat	catacagaat	600
30	caggcoagat	ttgtcagcgc	tgggatcatc	agacaccaca	cgggcacaaa	ttcttgcctg	660
	aaagatatcc	cgacaagggc	tttgatgata	attattgcgc	caatccgat	ggccagccga	720
	ggccatgggt	ctatactctt	gacccctaca	ccgcgtggga	gtactgtgca	attaaaaaat	780
	gcgctgacaa	tactatgaat	gacactgatg	ttcctttgga	aacaactgaa	tgcatccaag	840
	gtcaaggaga	aggctacagg	ggcactgtca	ataccatttg	gaatggaaat	ccatgtcagc	900
35	gttgggattc	tcagttactc	cacgagcatg	acatgaatcc	tgaaaatttc	aagtgtcaagg	960
	acctacgaga	aaattactgc	cgaaatccag	atgggtctga	atcaccctgg	tgtttttaca	1020
	ctgatccaaa	catcccgatt	ggctactgct	cccaaatcc	aaactgtgat	atgtocactg	1080
	gacaagattg	ttatcgtggg	aatgggcaaaa	attattatggg	caactttatc	caaaacaagt	1140
	ctggactaac	atgttcaatt	tgggacaaga	acatggaaga	cttcatctgt	catatctctc	1200
40	gggaaccaga	tgcaagttaag	ctgaatgaga	attactgcgc	aaatccagat	gatgatgtct	1260
	atggaccctg	gtgtcacagg	ggaaatccac	tcaattcctg	ggattattgc	octatttttc	1320
	gttgtgaagg	tgataccaca	cctacaatag	tcaattttaga	ccatcccgta	atatctctgt	1380
	caaaaaaggaa	acaaattgca	gtgtgaaatg	ggaatccaac	acgaacaaac	ataggatgga	1440
	tggttagttt	gagatcacaga	aataaacata	ctcgggagg	atcatgtgata	aaggagagtt	1500
45	gggtctttac	tgcaacagac	tgtttccctt	ctcgagactt	gaagagttat	gaagcttggtg	1560
	tgtgaaattca	tgatgtccac	ggaagaggag	atgagaaaatg	caaacaggtt	ctcaattgtt	1620
	cccgctgtgt	atatggccct	gaaggatcag	atctgggttt	aatgaagctt	gccaggcctg	1680
	ctgtcctcga	tgattttgtt	agtaacgattg	atttaccatga	ttatggctgc	acaattcctg	1740
	aaaagaccag	ttgcaagtgt	tatggctggg	gtctacactgg	attgatcaac	tatgatggcc	1800
50	tattacagat	ggcacactct	tatataatgg	gaaatgacag	atcgatcgac	catcatcgag	1860
	ggaaggtgac	ctctaatgag	tctgaaatat	gtgctggggc	tgaaaagatt	ggatcaggac	1920
	catgtgaggg	ggattatcgt	ggccactgtg	acataaaatg	agaatgtgtc	agaatgtgtc	1980
	ttggtgtcat	tgttccctgt	cgtggatgtg	ccattccaaa	tcgtcctgtg	attttgtctc	2040
	gagtgcata	ttatgcnaaa	tggtatcac	aaattatttt	aacataaag	gtaccacagt	2100
55	ca						2102
	<210>	88					
	<211>	360					
60	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					

60	80	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5
4560	4500	4440	4380	4320	4260	4200	4140	4080	4020	3960	3900	3840
3780	3720	3660	3600	3540	3480	3420	3360	3300	3240	3180	3120	3060
3000	2940	2880	2820	2760	2700	2640	2580	2520	2460	2400	2340	2280
2220	2160	2100	2040	1980	1920	1860	1800	1740	1680	1620	1560	1500
1440	1380	1320	1260	1200	1140	1080	1020	960	900	840	780	720
660	600	540	480	420	360	300	240	180	120	60	0	0

[illegible]

	cctgaagttc	togatgattc	cataaataatg	aaacattttg	aatccttcaa	acgtgctgac	1200
	atctatgc	tggtgcttagt	attctgggaa	attgctcgac	gatgttccat	tggtgggaatt	1260
	catgaagatt	accgaactgc	ttattatgat	ctgtgacctt	ctgacccatc	agttcgaagac	1320
	atgagaaagt	ttgtttgtga	acagaaagta	aggccaaata	tcccaaacag	atggcagagc	1380
5	tgtgaagct	tgagagtaat	ggctaaaatt	atgagagaat	cttgctatgc	caatggagca	1440
	gctaggctta	cagcattgag	gattaagaaa	acattatcgc	aactcagcta	acaggaaggg	1500
	atcaaaatgt	aa					1512
10	<210>	94					
	<211>	4044					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
15	<300>						
	<302>	Flk1					
	<310>	AF035121					
	<400>	94					
20	atgcagagca	agggtgctgt	ggcgtgcgcc	ctgtggctct	gcgtggagac	ccggggccgcc	60
	tctgtggggt	tgcttagtgt	ttctcttgat	ctgccaggcg	tcagcataca	aaaagacata	120
	cttacaattt	aggctaatac	aactcttcaa	attacttgca	ggggcagagag	ggacttggag	180
	tggtctttggc	ccaataatca	gagtggtcgt	gagcaaaagg	tggaagtgac	tgagtgacgc	240
	gatggcctct	ctgtgaagac	actcacaatt	ccaaaagtga	tcggaaatga	cactggagcc	300
25	tacaagtgtct	tctacgggga	aactgacttg	gctcggttca	tttatgtcta	tgctcaagat	360
	tacagatctc	catttattgc	ttctgttagt	gaccacacgt	gagtcgtgta	cattactgag	420
	aaacaaaaca	aaactgttgt	gattccatgt	ctcgggtcca	tttcaaatct	caactgtgca	480
	ctttgtgc	gatacccgga	aaagagattt	gttctctgat	gtaacagaat	ttctctggag	540
	agcaagaagg	gctttactat	tcccagctac	atgatcagct	atgctggcat	ggtctctctg	600
30	gaagcaaaaa	ttaatgatga	aagttaaccg	tctattatgt	acatagttgt	cgttgtaggg	660
	tataggtatt	atgatgttgt	ctcagtgctg	tctcatggaa	ttgaactatc	tggtggagaa	720
	aagcttgtct	taaatgtgac	agcaagaact	gaactaaatg	tggggattga	cttcaactgg	780
	gaataccctt	cttcgaagca	tcagcataag	aaacttgtta	accgagacct	aaaaaccgag	840
	ctctggagtg	agatgaagaa	atttttgagc	accttaacta	tagatgggtg	aaaccggagt	900
35	gaccaaggat	tgtacacctg	tgacagctcc	agtgggctga	tgaccaagaa	gaacagcaca	960
	tttgtcaggg	tccatgaaaa	accttttgtt	gcttttgtaa	gtggcatgga	atctctgggtg	1020
	gaagccacgg	tgggggagcg	tgtcagaatc	ctcgcgaagt	accttggtta	cccaccccca	1080
	gaataaaatt	ggatataaaa	tgggaatccc	cttgagttca	atcacacaa	taaaagcggg	1140
	catgtactga	cagattatgga	agtgaagtga	agagacacag	gaatattac	gttcatcctt	1200
40	accaatcccc	tttcaaagga	gaagcagagc	catgtgtgtc	ctctggtgtg	gtatgtcccc	1260
	ccccagattg	gtgagaattc	tctaattctc	ctgtgtgatt	ccacacagta	cggcaccaact	1320
	caaacgctga	catgtacggt	ctatgcacat	ctctccccc	atcacatcca	ctggtattgg	1380
	cagtggaagg	aagatgtgct	caacgagccc	agccaagctg	tctcagtgac	aaaccccatc	1440
	ctttgtgaag	aatgtggaga	tgtggaggag	ttcccaggga	gaataaaatt	tgaagttaatt	1500
45	aaaaataaat	ttgtctaat	tgaaggaaaa	aaacaaactg	taagtacctt	tgttatccaa	1560
	gcggcaaatg	gtcacaatgt	gtacaaatgt	gaagcggtca	acaaagtcgg	gagagggagag	1620
	aggggtgatc	ccttccacgt	gaccaggggt	cctgaattta	ctttgcaacc	tgacatcgag	1680
	ccccactgagc	aggagagcgt	gtcttttgtg	tgacactcgag	acagattctac	gtttgagaa	1740
	ctcacatggt	acaagctttg	cccacagcct	ctgccaatcc	atgtgggaga	gttgcccaac	1800
50	ctgttttgta	agaactttga	tactcttttg	aaattgaaat	ccacacatgt	ctctaatagc	1860
	acaaattgaca	ttttgatcat	ggagctttaag	aatgcattcc	tgacaggaac	aggagactat	1920
	gtctgctctg	ctcaagcagc	gaagaccaa	aaaagacatt	gcgttggtcag	gcagctcaaca	1980
	gtccttagagc	gtgtggcacc	cacgatccac	ggaacacttg	agaatcagac	gacaagtatt	2040
	ggggaagagc	tcgaagtctc	atgcacggca	ctcgggaatc	cccctccaca	gatcattgttc	2100
55	tttaagaata	atgagaccct	tgtagaagac	tcaggacttc	tattgaagga	tggggaaccg	2160
	aacctcacta	tcgcgcagct	gaggaaggag	gacgaaggcg	cttcacacct	ccagccatgc	2220
	agtgttctgt	gcgtgtcaaa	agtggaggca	ttttcataaa	tagaaggtgc	ccaggaagaa	2280
	acggaactgt	aaatcatatc	tctagttagc	acggcggtga	ttgccattgt	ttgtggagta	2340
	cttcttgtca	tctctctcag	gaccgttaag	cgggccaatg	gaggggaact	gaagacagcg	2400
	tacttgtcca	tgtctatgga	tccagatgaa	ctccattggc	tgaaacagctg	tgaaacagctg	2460
60	ccttatgatg	ccagcgaatg	ggaattcccc	agagaccggc	tgaagctagg	taagcctctt	2520
	ggcgtggtgt	cctttgggca	agtgattgaa	gcagatgcct	ttggaattga	caagacagca	2580

	acttgcagga	cagtagcagt	caaaatgttg	aaagaaggag	caacacacag	tgagcatcga	2640
	gctctcatgt	ctgaactcaa	gatcctcatt	catattggct	accatctcaa	tgttggtcaac	2700
	ctcttcagggt	ctctgtaccaa	gccaggagg	ccactcatgg	tgatttgttga	attctgcgaaa	2760
	tttggaaacc	tgtccactta	ctcgaggagc	aagagaaatg	aatttgtccc	ctacaagacc	2820
5	aaagggcgac	gattccgtga	agggaaagac	tacgttggag	caatccctgt	ggactctgaaa	2880
	cgggccttgc	acagcatcac	cagtagccag	agctcagcca	gctctggatt	tgtggaggag	2940
	aagtccctca	gtgatgtaga	agaagaggaa	gctcctgaag	atctgtataa	ggacttccgt	3000
	accttggagc	ctcttgactg	ttacagcttc	caagtggcta	agggcatgga	gtctctggca	3060
	tgcggaaagt	gtatccacag	ggacctggcg	gcacgaataa	tccctcttatc	ggagaagAAC	3120
10	tgggttaaaa	cttgtgactt	tggcttggcc	cgggataatt	ataaagatcc	agattatgtc	3180
	agaaaaaggag	atgctgcgct	ccctttgaaa	tggatggccc	cagaaacaat	tttctacaga	3240
	gtgtacacaa	tcacagatga	cgtctggctc	tttgggtgtt	tgctgtggga	aatattttcc	3300
	ttaggtgctt	ctccatattc	tgggttaaa	atgtatgaag	aatttgtgag	gcgattgaaa	3360
	gaaggaaact	gaatgagggc	ccctgattat	actacaccag	aaatgtacca	gaccatgctg	3420
15	gactgctggc	acggggagcc	cagtcagaga	ccacgctttt	cagagtttgt	ggaacatttg	3480
	ggaaatctct	tgcaagctaa	tgctcagcag	gatggcaaat	actacattgt	tcttccgata	3540
	tcagagactt	tggacatgga	agaggattct	ggactctctc	tgccctaccc	acctgtttcc	3600
	tgtatctgag	aggaggaagt	atgtgacccc	aaattccatt	atgacaacac	agcaggaatc	3660
	agtcagtatc	tgcagaacag	taagcgaaag	agccggcctg	tgaggtgtaa	aaactttgaa	3720
20	gatatccocgt	tagaagaacc	agaagttaaa	gtaatccagc	atgacaacaa	cagcgaaact	3780
	ggatctgggtc	ttgcctcaga	agagctgaaa	actttggaag	acagaaacca	attatctcca	3840
	ttctttgggtg	gaatgggtgc	cagcaaaaagc	agggagctct	tggcatctga	agggctcaaac	3900
	cagacaagcg	gctaccacgc	cggatatacc	tccgatgaca	cagacaacac	cggtgactcc	3960
	agtgaggaaag	cagaaacttt	aaagctgata	gagattggag	tgcaaacccg	tagcacagcc	4020
25	cagattctcc	agcctgactc	gggg				4044
	<210>	95					
	<211>	4017					
30	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	Flt1					
35	<310>	AF063657					
	<400>	95					
	atgggtcagct	actggggacac	cggggttcctg	ctgtgcgcgc	tgctcagctg	tctgtctctc	60
40	acaggatctca	gttcagggttc	aaaattaaaa	gatcctgaac	tgagttttaa	agggaccacc	120
	cacatcatgct	aagcaggcca	gacactgcat	ctccaatgca	ggggggaagc	agcccataaa	180
	tgggtttttg	ctgaaatgggt	gagtaaggaa	agcgaaaggg	tgagcatcaa	ttaattctgc	240
	tgtggaagaa	atggcaacaa	attctgcagt	actttaacct	tgacacacgc	taaacgcaac	300
	cacactgggt	tctacagctg	caaatatcta	gctgtacctc	cttcaaaaga	gaaggaacaa	360
	gaattctgcaa	tctatatatt	tattagtgat	acaggtagac	ctttctgtga	gatgtacagt	420
45	gaaatccccc	aaattatata	catgactgaa	ggaaggggag	tctgcatctc	ctgcgcgggt	480
	acgtcacctc	tactttaaaa	aagtttccac	tgacaccttt	gatccctgat	540	
	ggaaaaacgca	ttaatctggga	cagttagaaag	ggcttcacat	tatcaaatgc	aacgtacaaa	600
	gaaatagggg	ctctgacgtg	tgaagcaaca	gtcaaatggg	atttgtatata	gacaaactat	660
	ctccacacat	gacaaaacaa	tacaatcata	gatgtccaaa	taagcacacc	acgcccagtc	720
50	aaattactta	gaggccatac	tctgtctctc	aatgttactg	ctaccactcc	cttgaacacg	780
	agagtttcaa	tgacctggag	ttacctgat	gaaaaaaa	agagagcttc	cgtaaggcga	840
	cgaattgacc	aaagccaattc	ccatgcacac	atattctaca	gtgttctttc	tattgcacaa	900
	atgcagaaac	aaagacaaag	actttatact	tgtctgtata	ggagtgtgac	atcaattcaa	960
	tctgttaaca	ctctcagtga	tatatatgat	aaagcattca	tcactgtgaa	acatcgaaaa	1020
55	cagcagggtg	tgaaaaccgt	agctggcaag	cggctctacc	ggctctctat	gaaagtgaag	1080
	gcatttccct	cgccggaagt	tgtatgggtta	aaagatgggt	tgctctgcag	tggagaaatc	1140
	gctcgtctatt	tgaactcgtg	ctactcgtta	attatccaat	acgttaactga	agaggaatgc	1200
	gggaattata	caactctgct	gagcataaaa	cagtcacaa	tggtttaaaa	ctctcatgcc	1260
	actctcaattg	tcaatttggaa	accacagatt	tacgaaaggg	cctgtgtctc	gtgtccagac	1320
60	cgggtctctc	accacactgg	cagcagacaa	atctctgact	gtacccgata	tggtatcccc	1380
	caacctcaaa	tcaagtgggt	ctggcacccc	tgtaaccata	atcaattgca	agcaagggtg	1440
	gaacttttgt	ccaataatga	agagtccttt	atctctggat	ctgacagcaa	catgggaaac	1500

[illegible]

<213> Homo sapiens

<300>

<302> KDR

<310> AF063658

<400> 97

	atggagagca	agggtgctgct	ggcogtgcgc	ctgtggctct	gcgtggagac	ccggggccgc	60
	tctgtggggt	tgccctagtg	tctctctgat	ctgcccaggc	tcagcataca	aaaagacata	120
10	cttacaatta	aggctaatac	aactcttcaa	attacttgca	ggggacagag	ggacttggac	180
	tggtcttggc	ccaataatca	gagtgggcagt	gagcaaaagg	tggagggtgac	tgagtgcagc	240
	gatggcctct	tctgtaagac	actocaactt	ccaaaagtga	toggaaatga	cactggagcc	300
	tacaagtgtc	tctaccggga	aactgacttg	gcctcggta	tttatgtcta	tgttcaagat	360
	tacagatctc	cattttatgc	tctgtttagt	gaccaacatg	gagtcgtgta	cattactgag	420
15	aaacaaaaa	aaactgtgtg	gattccatgt	ctcgggtcca	tttcaaactc	caacgtgtca	480
	ctttgtgcaa	gatacccgag	aaagagattt	gttccctgat	gtaacagaat	tctctgggac	540
	agcaagaagg	gottttactat	tcccagctac	atgatcagct	atgctggcat	ggctctctgt	600
	gaagcaaaa	taatatgata	aagttaccag	tctattatgt	acatagtgtg	ctgtgtaggg	660
	tataggattt	atgatgtggt	tctgagtcgg	tctcatggaa	ttgaactatc	tgttggagaa	720
	aagcttgtct	taaatgtgac	agcaagaact	gaactaaatg	tggggattga	cttcaactgg	780
	gaataccctt	cttcgaagca	tcagcataag	aaacttgtaa	accgagacct	aaaaaccag	840
	tctgggagtg	agatgaagaa	atttttgagc	accttaacta	tagatgtgtg	aaaccggagt	900
	gaccaggagt	gtgacacctt	tgacagctcc	agtgggctga	tgaccaagaa	gaacagcaca	960
	tttgtcaggg	tccatgaaaa	accttttgtt	gcttttggaa	gtggcatgga	atctctgtgt	1020
25	gaagccacgg	tgggggagcg	tgtcagaatc	ctctcggaat	acctttgtga	ccacccccca	1080
	gaataaaat	gggtataaaaa	tgggaataccc	cttgagtcca	atcacacaat	taaaagcggg	1140
	catgtactga	cgtatttgga	agtgagtgaa	agagacacag	gaattatcac	tgtcatctct	1200
	accaatcccc	tttcaaagga	gaagcagagc	catgtgtgtc	ctctgtgtgt	gtatgtccca	1260
	ccccagattg	gtgagaatct	tctaatctct	ctctgtgatt	ctcgaccagt	cggcaccact	1320
30	caaacgctga	catgtacggt	ctatgccatt	ctctccccc	atcacatcca	ctggatttgg	1380
	cagttggagg	aagagtgctc	caacgagccc	agccaaagct	tctcagtgac	aaaccacatc	1440
	cttgttgaag	aatggagaag	tgtgtggagg	ttccaggggg	gaataaaaat	tgaagttaat	1500
	aaaaatacct	tgtctcaaat	tgaaggaaaa	aaacaaaact	taagtaccct	tgttatccaa	1560
	gcggcaaatg	tgtcagcttt	gtacaaatgt	gaagcgggtc	acaaagtctg	gagagggag	1620
35	aggggtgatc	cttctccag	gaccaggggt	ctgaaatata	ctttgcaacc	tgacatgcag	1680
	cccactgagc	aggagagcgt	gtctttgtgg	tgcaactgac	acagatctac	gtttggagac	1740
	ctcacactgt	acaagcttgg	cccacagcct	ctgccaatcc	atgtgggaga	gttgcccaca	1800
	ctgttttgca	agaactctgga	tactctttgg	aaattgaatg	ccaccatgtt	ctctaatagc	1860
	acaaattgac	ttttgatcat	ggagcttaag	aatgcactct	tgcaggacca	agcagactat	1920
40	gtctgcctgt	ctcaagacag	gaagaccca	aaaagacatt	gcgtggtcag	gcagctcaca	1980
	gtctcagtag	gtgtggcacc	cacgatcaca	ggaaaccttg	agaatcacag	gacaagtatt	2040
	ggggaaagca	tcgaagtctc	atgcacggca	cttgggaatc	ccctccacac	gatcatctgt	2100
	tttaagata	atgagaccct	tgtagaagac	tccaggtcat	tattgaagga	tgggaacctg	2160
	aaacctcact	tcgcgacaggt	gagggaaggag	gacgaaggcc	cttcaacctg	ccaggaactc	2220
45	agtggtctgt	gcgtgtgaaa	agtggaagca	tttttcataa	tagaagggtc	ccaggaaaag	2280
	acgaactctg	aaatcatctt	tctagttagc	acggcggtga	ttgccatggt	cttctgggta	2340
	cttcttgtca	tcatctctac	gaccgttaag	cgggccaatg	gaggggaaat	gaagcacagg	2400
	tacttgtcca	tcgtcatgga	tcagatgaa	ctcccatgtg	atgaacattg	tgaacgactg	2460
	cttctatgat	ccagcaaatg	ggaaattccc	agagaccggc	tgaagcttag	taagcctctt	2520
50	ggccgtgtgt	cttcttgcca	agtgattgaa	gcagatgctt	ttggaaatga	caagcacagc	2580
	acttgacgga	cagtagcagt	caaaatgttg	aaagaaggag	caacacacag	tgagcatcac	2640
	gctctcatgt	ctgaaactcaa	gactctcatt	catatttgct	accatctcaa	tgtggtcaac	2700
	cttctagagt	ctgtgaccaa	gccaggaggg	ccaatcatgg	tgattgtgga	atttgcacaa	2760
	tttggagacc	tgtccaactta	cctgaggagc	aaagaaaatg	aatttgtccc	ctcaacagac	2820
55	aaagggccac	gattccgtca	aggggaagac	tacgttggag	caatccctgt	ggatctgaaa	2880
	cgggcgtctg	acagcatcac	cagtagccag	agctcagcca	gctctggatt	tgttggagag	2940
	aagtccctca	gtgatgtgaa	agaagaggaa	gctcctgaag	atctgtataa	ggctccctgt	3000
	actctggagc	atctcatctg	ttacagcttc	caagtggtcta	agggcatgga	gttcttgcca	3060
	tcgcgaaagt	gtatccacag	ggacctggcg	gcacgaaata	tctcttatc	ggagaagaac	3120
60	gtggttataa	tctgtgactt	tggcttggcc	cgggatattt	ataaagatcc	agatattgtc	3180
	agaaaaggag	atgtcgcctt	ccctttgaaa	tggatgtccc	cagaaaacat	ttttgacaga	3240
	gtgtacacaa	tccagagtga	cgtctggtct	tttgtgtctt	tgctgtggga	aatattttcc	3300

	ttaggtgctt	ctccatatcc	tggggtaaag	attgatgaag	aattttgtag	gcgattgaaa	3360			
	gaaggaacta	gaatgagggc	ccctgtattat	actacaccag	aaatgtacca	gaccatgctg	3420			
	gactgtcgcc	acggggagcc	cagtcagaga	cccactgttt	cagagttggt	ggaaactttg	3480			
5	ggaatctctc	tgcaagctaa	tgctcagcag	gatggcaaa	actacttgt	tcttcogata	3540			
	tcagagactt	tgagcatgga	agaggattct	ggactctctc	tgccatccct	acctgtttcc	3600			
	tgtatggagg	aggaggaagt	atgtgacccc	aaattccatt	atgacaaac	agcaggaatc	3660			
	agtcagtat	tgacagaacg	taagcgaaag	agccggcctg	tgagtgtaaa	aacatttgaa	3720			
	gatatccogt	tagaagaacc	agaagtataa	gtaattcccg	atgacaaaca	gacggacagt	3780			
	ggatctggtt	ttgcctcaga	agagctgaaa	actttggaag	acagaaccaa	attatctcca	3840			
10	tcttttgggt	gaatgggtgc	cagcaaaaag	agggagctgt	tggtctctga	aggtctcaac	3900			
	cagacaagcg	gctaccagtc	cggatatcac	tccgatgaca	cagacaccac	cgtgtactcc	3960			
	agtgaggagc	cagaactttt	aaagctgata	gagattggag	tgcaaacccg	tagcacagcc	4020			
	cagatttctc	agcctgactc	ggggaccaca	ctgagctctc	ctcctgttta	a	4071			
15	<210> 98									
	<211> 1410									
	<212> DNA									
	<213> Homo sapiens									
20	<300>									
	<302> MMP1									
	<310> M13509									
25	<400> 98									
	atgcacagct	ttcctccact	gctgctgctg	ctgttctggg	gtgtggtgtc	tcacagcttc	60			
	ccagcgactc	tagaaaacaca	agagcaagat	gtggacttag	tcacagaaata	cctggaaaaa	120			
	tactacaacc	tgaagaatga	tgggaggcaa	gttgaaaagc	ggagaaatag	tggtccagtg	180			
	gttgaaaaat	tgaagcaaat	gcaggaaatc	tttgggctga	aagtgacttg	gaaccagat	240			
30	gtctgaaccc	tgaaggatga	gaagcagccc	agatgtggag	tgccatgatg	ggctcagttt	300			
	gtcctcaact	agggaacccc	tcgctgggag	caaacacatc	tgaggtacag	gattgaaat	360			
	tacacgcccag	atttgccaag	agcagatgtg	gaccatgcca	ttgagaagac	cttccaaactc	420			
	tgagtaattg	tcacacctct	gacattccac	aaggtctctg	agggctcaagc	agacatcatg	480			
	atatcttttg	tcaggggaga	tcactcggac	aactctcctt	ttgatggacc	tgagggaat	540			
35	cttgctcatg	cttttcaacc	aggccagagt	attggagggg	atgctcattt	tgatgaagat	600			
	gaaaggtgga	ccaacaattt	cagagagtac	aacttacatc	gtgttgccgg	tcataagctc	660			
	ggccattctc	ttggactctc	ccattctact	gatatcgggg	ctttggacag	ccctagctac	720			
	acccttcagtg	gtgatgttca	gctagctcag	gatgacatg	atggcatcca	agccatacat	780			
	ggacgttccc	aaaaatctgt	ccagcccatc	ggcccacaaa	ccccaaaagc	gtgtgacagt	840			
40	aagcttcaact	ttgatgctat	aactacgatt	cggggagaga	tgatgttctt	taaaagacaga	900			
	ttctacatgc	gcacaaatcc	cttctaccgc	gaagttaggc	tcaatttcat	ttctgttttc	960			
	tgcccaacaac	tgcccaaatg	gcttgaagct	gottacgaat	ttgcccagac	agatgaagtc	1020			
	cggtttttca	aagggaataa	gtactgggct	gttcagggac	agaatgtgct	acacgggatac	1080			
	cccaaggaca	ctacagcttc	ctttggcttc	cttagaaactg	tgaagcatat	cgatgctgct	1140			
45	ctttctgagg	aaaacactgg	aaaaaacctac	ttcttttgtg	ctaacaataa	ctggagggtat	1200			
	gatgaatata	aatgacttat	ggatccaagt	tatcccaaaa	tgatgacaca	tgacttttct	1260			
	ggaattggcc	acaaagttag	tgagtttttc	atgaagaagt	gatttttcta	ttcttttcat	1320			
	ggaacaagac	aatacaaat	tgatcctaaa	acgaagagaa	ttttgactct	ccagaaagct	1380			
50	aatagctggt	tcaactgcag	gaaaaattga				1410			
	<210> 99									
	<211> 1743									
	<212> DNA									
	<213> Homo sapiens									
55	<300>									
	<302> MMP10									
	<310> XM006269									
60	<400> 99									
	aaagaaggtg	agggcagtg	gaatgatgca	tcttgcttc	cttgtgctgt	tgtgtctgcc	60			

	agtcctgctct	gcctatctct	tgagtggggc	agcaaaaag	gaggactcca	acaagatct	120
	tgcccagcaa	tacctagaaa	agtactacaa	cctcgaaaag	gatgtgaac	agtttagaag	180
	aaaggacagt	aatctcattg	ttaaaaaaat	ccaaggaaat	cagaagtctc	ttgggttgga	240
	gggtgacagg	aagctagaca	ctgacactct	ggaggtgatg	cgcaagccca	gggtgaggat	300
5	tctcgactgt	ggctcaactca	gctcctttcc	tggtgatccg	aagtgagaga	aaaccacact	360
	tacatcacagg	atttgtgaatt	atacaccaga	tttgccaaga	gatgctgtg	attctgccat	420
	tgagaaagct	ctgaaagctt	gggaagaggt	gactccaact	acattctcca	ggctgtatga	480
	aggagaggt	gatataatga	tctcttttgc	agttaaagaa	ctaggagact	tttactcttt	540
	tgatggccca	ggacacagtt	ttggtcatgc	ctacccacct	ggacgtgggc	tttatggaga	600
10	tattcaacttt	gatgatgat	aaaaatggac	agaagatgca	tcaggcacca	atttatctct	660
	cgttgctgct	catgaacttg	gccactccct	ggggctcttt	cactcagcca	acactgaagc	720
	tttgatgtac	ccaactctaca	actcaattcac	agagctcgcc	cagttccgcg	tttcgcaaga	780
	tgatgtgaat	ggcattcaat	ctctctacgg	acctccccct	gcctctactg	aggaacccct	840
	ggtgcccaca	aaatctgttc	cttcgggata	tgagatgcca	gccaaagtgt	atcctgcttt	900
15	gtccttcgat	gccatcagca	ctctgagggg	agaaatctct	ttctttaaag	acagatattt	960
	ttggcgaaaga	tccaactgga	accctgaacc	tgaatttcat	ttgatttctg	cattttggcc	1020
	ctctcttcca	tcataatttg	atgctgcata	tgaatttaac	agcagggaca	ccgtttttat	1080
	ttttaaaagg	aatgagttct	gggccatcag	aggaatcgag	gtacaagcag	gttatccaag	1140
	agggatccat	accctggggt	ttctctcaac	cataaggaaa	atgatgcag	ctgtttctga	1200
20	caaggaaaaa	aagaaaaacat	acttctttgc	agcggaacaaa	tactggagat	ttgatgaaaa	1260
	tagccagctc	atggagacag	gcttccctag	actaatagct	gatgaatttc	caggagttga	1320
	gctcaaggtt	gatgctgtat	tacaggcatt	tggatttttc	tactcttcca	gtggatcaat	1380
	acagttttg	tttgacccca	atgccaggat	ggtgacacac	atatataaga	gtaacagctg	1440
	gttacattgc	taggcagagat	agggggagaa	cagatattgg	tggttttaat	aaatctaata	1500
25	ataattctac	taattgtatta	tgagccaaaa	tggttaaatt	ttctgtgact	ttctgtgact	1560
	gaagaaagat	agccttgacg	atatctgcac	gtgtcatgaa	gaattgtttc	ggaaattctc	1620
	actctgtttt	gaattgcact	gaacgaatt	aagaaatact	catgtgcaat	aggtgagaga	1680
	atgtattttc	atagatgtgt	tattactctc	tcaataaaaa	gttttatatt	gggcctgttc	1740
30	ctt						1743
	<210> 100						
	<211> 1467						
	<212> DNA						
35	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> MMP11						
	<310> XM009873						
40	<400> 100						
	atggctccgg	ccgcttggct	ccgcagcgcg	gcgcgcgcgc	cctcctctgc	cccgatgctg	60
	ctgctgtctg	tccagcgccg	gccgtgctgt	gcccgggctc	tgccgcggga	cgccaccacg	120
	ctccatgcgc	agaggagggg	gccacagccc	tgccatgcag	cctgcgccag	tagcccgcca	180
45	cctgcacctg	ccaagcagga	agcccccccg	cctgcacaga	gcctcaggcc	tcccgcgtgt	240
	ggcgtagccg	acccatctca	tgggctgagt	gcgccgaacc	gacagaagag	gttcgtgctt	300
	tctggcgggc	ctctggggagaa	gacggacctc	acctacagga	tcttctcggt	cccatggcag	360
	ttggcgaggg	agcaggtgcg	gcagacgagt	gcagagggcc	taaaaggtatg	gagcagatgtg	420
	acggcaactca	cttctactga	ggtgcacgag	ggccgtgctg	acatcatgat	cgactctccc	480
50	aggtactgcg	atggggacga	cctgcggttt	gtcgggcctg	ggggcactct	ggcccatgct	540
	ttcttcccga	agactcacgc	agaaggggat	gtccactctg	actatgatga	gacctgggact	600
	atcggggatg	accagggcac	agacctgctg	caggtggcag	cccatgaatt	tgcccgacgt	660
	ctggggctgc	agcacacaac	agcagccaaag	gcctgtgatg	cgcccttcta	cacctttcgc	720
	taccactcga	gtctcagccc	agatgactgc	aggggcgttc	aacacctata	tgcccgagcc	780
55	tggccccactg	tcacctcoag	gaccccagcc	ctgggcccccc	aggtggggat	agacaccaat	840
	cgagttgcac	cgtctggagc	agacggcccg	ccagatgcct	gtgagggcct	ctttgacgcg	900
	gtctccacca	tccagaggca	gctctttttc	ttcaaaagcg	gctttgtgtg	ggcactgcgt	960
	ggggcccgag	ctcagccggg	ctaccagcga	gtccactggc	gccactggca	cggtctgccc	1020
	agccctgtgg	acgtgctctt	cgaggatgcc	cagggcacaa	tttggttctt	ccaaggtgct	1080
60	cagtactggg	tgtacgacgg	tgaaaagcca	gtccttgggc	ccgcacccct	caccagagct	1140
	ggcctgtgtg	ggttcccggt	ccatgctgcc	ttgggtctgc	gtcccgagaa	gaacaagatc	1200
	tactctcttc	gaggcaggga	ctactggcgt	ttccacccca	gcacccggcg	tgtatagacgt	1260

	cccggtgccc	gcaggggccac	tgactggaga	gggggtgccc	ctgagatcga	cgctgccttc	1320
	aggatgctg	atggctatgc	ctacttctcg	cgcgggcgcc	tctactggaa	gtttgacct	1380
	gtgaagctga	aggctctcga	aggcttcccc	cgtctcgtgg	gtcctgactt	ctttgctgt	1440
5	gccgagcctg	ccaacacttt	cctctga				1467
	<210> 101						
	<211> 1653						
	<212> DNA						
10	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> MMP12						
	<310> XM006272						
15	<400> 101						
	atgaagtctt	ttctaatact	gtcctctgcag	gccactgcct	ctggagctct	tccccgaac	60
	agctctacaa	gcctggaaaa	aaataatgtg	ctatttgggtg	agagataact	agaaaaattt	120
	tatggccttg	agataaaaca	acttccagtg	acaaaaatga	aatatatgtg	aaacttaatg	180
20	aaggaaaaaa	tccaagaaat	gcagcacttc	ttgggtctga	aagtgcacgg	gcaactggac	240
	acatctaccc	tggaatgatg	gcacgcacct	cgatgtggag	tcccccgatg	ccactcaattc	300
	agggaaatgc	cagggggggc	cgtatggagg	aaacattata	tcacctacag	aatcaaatat	360
	tacacacctg	acatggaacc	tgaggatggt	gactacgcaa	tcgggaaagc	tttccaaagta	420
	tgaggtaaat	ttacccccct	gaaattcagc	aagattaaac	caggcatggc	tgacatttgg	480
25	gtgggttttg	cccggtggagc	tcatggagac	ttccatgctt	ttgatggcga	aggtggaatc	540
	ctagcccatg	cttttggacc	tggtctctggc	attggagggg	atgcacattt	cgatgaggac	600
	gaattctgga	ctacacattc	aggagnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	660
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	720
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	780
30	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	840
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	900
	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	960
	aaatatgttg	acatcaacac	atttcgcctc	ttctgtgatg	acatacgttg	cattccagtcc	1020
	ctgtatggag	accocaaaga	gaaccaacgc	ttgccaaatc	ctgacaaatc	agracagact	1080
35	ctctgtgacc	ccaatttgag	ttttgatgct	gtcactaccg	tggggaaata	gatctttttc	1140
	ttcaagaaga	gggtctctcg	gtcgaaggtt	tctgagagac	caaagaccag	tgtttaattta	1200
	atttctctcc	tattggccaac	cttggcatct	ggcattgaag	ctgcttatga	aattgaagcc	1260
	agaaatcaag	ttttttcttt	taaaagatgac	aaatactggt	taattagcaa	tttaagacca	1320
	gagccaaatt	atcccaagag	catacattct	tttgggtttc	ctaaactttgt	gaaaaaaatt	1380
40	gatgcagctg	tttttaaccg	acgtttttat	aggacctact	tctttgttaga	taaccagtat	1440
	tgagggtatg	atgaaggagg	acagatgatg	gacctgggt	atcccaactg	gattaccaag	1500
	aacttccaag	gaatcgggcc	taaaattgat	gcagctctct	actctaaaaa	caatactac	1560
	tatttcttcc	aaggatctaa	ccaatttgaa	tatgaactcc	tactccaacg	tatcacccaa	1620
45	acactgaaaa	gcaatagctg	gtttggttgt	tag			1653
	<210> 102						
	<211> 1416						
	<212> DNA						
50	<213> Homo sapiens						
	<400> 102						
	atgcacccag	gggtcctggc	tgcttctctc	ttcttgagct	ggactcattg	tcggggccctg	60
	cccttcccca	gtgggtggga	tgaagatgat	ttgtctgagg	aagacctcca	gtttgcagag	120
55	cgctacctga	gtactacta	ccatctcaca	aatctcgagg	gaatcctgaa	ggagaaatga	180
	gcaagctcca	tgactgcact	gctccgagaa	atgcagctct	tcttcgggtt	agaggtgact	240
	ggccaaactct	acgataaac	cttagatgtc	atgaaaaagc	caagatgcgg	gggtctctgat	300
	gtggggtgaat	acaatgtttt	ccctcgaaat	cttaaatggt	ccaaaaatgaa	tttaacctac	360
	agaaattgga	attacacccc	tgatgatgact	cattctgaag	tcgaaaaggc	attcaaaaaa	420
60	gcctcctgga	tttggctcga	tgtaactcct	ctgaatttta	ccagactcca	cgatggcatt	480
	gctgacatca	tgatctcttt	tggaaattaa	gagcatggcg	acttctaccc	atttggagg	540
	ccctctggcc	tgtctggctca	tgtctttctt	ctcggggcaa	attatggagg	agatgcccat	600

	tttgcgatgat	atgaaacctg	gacaagtagt	tccaaaggct	acaacttggt	tcttgtgtgct	660
	gcgcgatgagt	tccggcaactc	cttaggctctt	gaccactcca	aggaccctgg	agcactcatg	720
	tttctctatct	acacctacac	cggcaaaagc	cactttatgc	ttcctgatga	cgatgtacaa	780
	gggatccagat	ctctctatgg	tccaggagat	gaagacccca	accctaatac	tccaaaaaacg	840
5	ccagacaacat	tgaccctctc	cttatccctt	gatgccatta	ccaggtctccg	aggagaaaca	900
	atgatctctta	aagacagatt	cttctggcgc	ctgcactcctc	agcagggttga	tcggcagagtg	960
	tttttaacga	aatcattttg	gccagaactt	cccaaccgta	ttgatgtctgc	atgtaggacac	1020
	ctcttctcatg	acctcatctc	catcttccaga	ggtagaaaat	tttgggctct	taatggttat	1080
	gacatctctg	agggttatcc	caaaaaata	tctgaactgg	gtcttccaaa	agagtttaag	1140
10	aagataaagt	cagctgttca	ctttgaggat	acaggcaaga	ctctcctgtt	ctcaggaaac	1200
	cagggtctgga	gatattgatga	tactaacctat	attatggata	aagactatcc	gagactaata	1260
	gaagaagact	tcccaggaa	tggtgataaa	gtagatgctg	cttatgagaa	aaatgggtat	1320
	atctattttt	tcaacggacc	catcacagtt	gaatacagca	tctggagtaa	ccgtattggt	1380
	cgcgctcatg	cagcaaatcc	cattttctgg	tgttaa			1416
15	<210> 103						
	<211> 1749						
	<212> DNA						
20	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> NMP14						
	<310> NM004995						
25	<400> 103						
	atgtctcccc	ccccaagacc	cccccgctgt	ctcctgtccc	ccctgtctac	gctcggcacc	60
	gcgctcgctc	ccctcggtcc	ggcccaaaagc	agcagcttca	gccccgaagc	ctggctacag	120
	caatatggct	acctgtcctcc	cggggacctta	cgtaccccaca	cacagcgctc	accocagttca	180
30	ctctcagcgg	ccatcgctgc	catgcagaag	ttttacggct	tgcaagtaac	aggcaaaagct	240
	gatgcagaca	ctatgaaggc	catgagggcg	ccccgatgtg	gtgttccaga	caagtttggg	300
	gctgagatca	aggccaatgt	tccaaggaag	cgtcacgccca	tccagggtct	caaatggcaa	360
	cataatgaaa	tactttcttc	catccagaat	tacacccccca	aggtggggcga	gtatgccaca	420
	tacagggcca	ttcgcaaggc	gttcccgctg	tgggagagtg	ccacaccact	gcgcttccgc	480
35	gaggtgcac	atgctcatat	cgtgaggggc	catgagaagc	aggccgcacat	catgactcttc	540
	tttgcagagg	gcttccatgg	cgacagcagc	cccttcgatg	gtgagggcgg	cttccctggcc	600
	catgctactc	tcccaggccc	caacattgga	ggagacaccc	actttgactc	tgcgcagcct	660
	tggaactgtca	ggaatgagga	tctgaatgga	aatgacatct	tcttgggtgc	tgtgcaacag	720
	ctgggccaatg	ccctggggct	cgagcattcc	agtgacccct	cgcccatcat	ggcacccttt	780
40	taccagtgga	tggacaacgga	gaatttttgt	ctgcccagatg	atgaccgcgc	gggcattccag	840
	caacttttag	gggtgtgagc	agggttcccc	accaagatgc	cccttcaacc	caggactacc	900
	tcccggcctct	ctgttctctga	taaaacccaaa	aacccaccct	atggggcccaa	catctgtgac	960
	gggaactcttg	acacgctggc	catgctccga	ggggagatgt	ttgtcttcaa	ggagcgctgg	1020
45	ttctggcggg	tgaggataaa	ccaagtgatg	gatggatacc	caatgcccat	tgccagattc	1080
	tggcgggggc	tgctctcgctc	catcaacact	gcctacagaga	ggaaggatgg	caaatctctg	1140
	ttcttcaaa	gagacaagca	ttgggtgttt	gatgaggcgt	ccctggaacc	tggtctcccc	1200
	aagcacatta	aggagctggg	ccgagggtctg	ccatcogaca	agatttgatg	tgctctcttc	1260
	tggtatgccca	atggaaaagac	ctactctctc	cgtggaaaaca	agttactaccg	tttcaacagg	1320
	gagctcaggg	cagtgatag	cgagtacccc	aagaaatcca	aagttctggga	aggagtcctc	1380
50	gagttctccca	gaggtgcatc	catgggcagc	gatgaagtag	tcacttactt	ctacaaggag	1440
	aacaaatact	ggaaattcaa	caaccagaag	ctgaaggtag	aaccgggcta	ccccaaagta	1500
	gcactcaggg	actggatggg	gtgcccatcg	ggagcgaggg	cggtatgaggg	gactgagag	1560
	gagacggagg	tgatcatcat	tgaggtggac	gaggaggcgc	gcggggcggtg	gagcggcgct	1620
	gcctgtgggtc	tgcctgctgt	gctgctgctc	ctgtgtctgg	cgggtggcctc	tgaagctctc	1680
55	ttcttcagac	gccaatgggac	ccccaggcga	ctgctctact	gcccagcgttc	cctgctggac	1740
	aaggtctga						1749
60	<210> 104						
	<211> 2010						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						

	gttaaaaaaa	tccgagaagt	gcagaagtcc	cttggaattgg	aggtgacggg	gaagctggac	240
	tcogacactc	tgagggtgat	gcgcaagccc	aggtgtggag	ttcctgacgt	tggtcacttc	300
	agaacctttc	ctggcatccc	gaagtggagg	aaaaccccac	ttacatacac	gattgtgaat	360
	tataccacag	atttgccaaa	agatgctggt	gattotgctg	ttgagaaagc	tctgaaagtc	420
5	tggaagagg	tgactccact	cacattctcc	aggotgtatg	aaggagagcg	tgatataatg	480
	atctctatgt	caggttagaga	acatggagac	ttttacccct	ttgatggacc	tggaatgttt	540
	ttggccctat	cctatgcccc	tggggccagg	attaatggag	atgccacctt	tgatgatgat	600
	gaacatttga	caacaggatac	aacaggggacc	attttatttc	tcgtctctgc	tcattgaatt	660
	ggccactccc	tggtgtctct	tcactcagcc	aacactgaag	ctttgatgta	ccactctcat	720
10	cactcactca	cagactcgtac	tcggttcocg	ctgtctcaag	atgatataaa	tggaattcag	780
	tcctctatgt	gacctcccc	tgactccctc	gagacccccc	tggtacccac	ggaacctgtc	840
	cctccagaac	ctgggacgcc	agccaaactgt	gatcctgctt	tgctctttga	tgctgtcagc	900
	actctgaggg	gagaaatcct	gatcttttaa	gacaggcact	tttggcgcaa	atccctcagg	960
	aagcttgaa	ctgaattgca	tttgatctct	tcattttggc	catctctctc	ttcaggcggt	1020
15	gatgcgcgat	atgaagtta	tagcaaggac	ctcgttttca	tttttaaagg	aatcaattc	1080
	tgggccatca	gaggaaatga	ggtacgagct	ggatacccaa	gaggcatcca	caccctaggt	1140
	ttccctccaa	cogtgaggaa	aatcgatgca	gccattctgt	ataaggaaaa	gaacaaaaa	1200
	tattctcttt	tagagacaaa	atactggaga	tttgatgaga	agagaaaattc	ctgggagcca	1260
	ggctttccca	agcaaatagc	tgaagacttt	ccagggaattg	actcaaatag	tgatgtcgtt	1320
20	tttgaagatt	ttgggtctct	ttattctctt	actggatctt	cacagtgtga	gtttgaccca	1380
	aatgcaaga	aagtgcacac	cactttgaag	agtaacagct	ggcttaattg	ttga	1434
25	<210> 109						
	<211> 1404						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
30	<300>						
	<302> MMP8						
	<310> NM002424						
	<400> 109						
35	atgtttctccc	tgaagacgct	tcattttctg	ctcttactcc	atgtgcagat	ttccaaggcc	60
	tttctgtgat	ctcttaaa	gaaaaataca	aaaactgttc	aggactacct	ggaaaagtcc	120
	taccaattac	caagcaacca	gtatcagctc	acaagggaag	atggcactaa	tgtagctggt	180
	gaaaagctta	aagaatgtca	gcgatttttt	gggttgaatg	tgacggggaa	gccaaatgag	240
	gaaactctgg	acatgatgaa	aaagcctcgc	tgtagagatg	ctgacaggtg	tggttttatg	300
	ttaaacccag	gaaaccccaa	gtgggaacgc	actaaactga	ctcacaggat	tcgaactcat	360
40	accocacagc	tgtagagagc	tgaggtagaa	agagctatca	aggatgcctt	tgaactcttg	420
	atgtgtgatc	cacctctcat	cttcaccagg	atctcacagg	gagaggcaga	tgacaacatt	480
	gctttttacc	aaagagatca	cgggtgacaat	ttccattttg	atggacccaa	tggaattcct	540
	gctcatgctc	ttcagccagg	ccaaggtatt	ggaggagatg	ctcattttga	tgccgaagaa	600
	acatgggaca	acacctccgc	aaattacaac	ttgtttcttg	ttgtgtctca	tgaaattbgt	660
45	cattctttgg	ggctctgtca	ctctctgac	cctggtgcct	tgatgtatcc	caactatgct	720
	ttcaggggaa	ccagcaacta	ctcactccct	caagatgaca	tcgatggcat	tcaggccatc	780
	tatggacttt	caagcaacc	tatccaaact	actggaccaa	gcacacccaa	acctctgtac	840
	ccagttttga	catttgatgc	tatcaccaca	ctcgtggag	aaataacttt	ctttaaagac	900
	aggtactctc	ggagaaggca	tcctcagcta	caaagatgct	aaatgaattt	tatttctcta	960
50	ttctggccat	cccttccaac	tggtatacac	gctgcttatg	aagattttga	cagagacctc	1020
	atttttccat	ttaaaggcaa	ccaatactgg	gctctgagtg	gctatgatat	tctgcaaggt	1080
	tattcccaag	atatatcaaa	ctatggcttc	ccacgacgct	tccaagcaat	tcacgagct	1140
	gtttctctca	gaagtataaac	atactctctt	gtaaatgacc	aattctggag	atatgataac	1200
	caagacaact	tcagtggacc	aggttatccc	aaaagcatat	caggtgcctt	tcacggaata	1260
55	gagagttaa	ttgatgcagt	tttccagcaa	gaacattctc	tcctatgtct	cagtggacca	1320
	agatatcag	catttgatct	tattgtctcag	agagttacca	gagttgcaag	aggccaataa	1380
	tggttaact	gtagatattg	ctga				1404
60	<210> 110						
	<211> 2124						
	<212> DNA						

[illegible]

[illegible]

	<213> Homo sapiens	
	<300>	
	<302> PKC eta	
5	<310> NM006255	
	<400> 114	
	atgtcgtctg gcaccatgaa gtccaatggc tatttgaggg tccgcacgtg ttgaggcagtg 60	
	gggtcgcagc ccaccccgctg gtccctgcgc cactcgcctc toaagaaggg ccaccagctg 120	
10	ctggaccacct atctcgacggt gagcgtggac caggctgcgc tggggccagac cagcaccagag 180	
	cagaagacca acaaaaaccac gtacaacgag gagttttgag ctaacgtcac cgacggcgccg 240	
	ccctcgcagt tggccgctctt ccacgagacc ccctcgggct acgacttcgt ggccaactgc 300	
	accctgcagt tccaggagct cgtcggcacg accggcgccct cggacacctt cgagggtttgg 360	
	gtggatctcg agccagaggg gaaagtattt ttggtaataa cccttaccgg gagtttccat 420	
15	gaagctactc tccagagaga ccggatcttc aaacatttta ccaggaaagg ccaaaagggct 480	
	atgcgaaggc gagtccacca gatcaatgga cacaagttca tggccacgta tctgagggcag 540	
	cccacctact gctctcactg caggagagttt atctggggag tgtttgggaa acagggttat 600	
	cagtgccaaat tgtgcacctg tgccttccat aaacgctgcc atcatctaat tgttacagcc 660	
20	tgtacttgcc aaaacaatat taacaaagtg gattcaaaaga ttgcagaaca gaggtttcggg 720	
	atcaacatcc cacacaagtt cagcatccac aactacaaag tgccaacatt ctgcgatcac 780	
	tgtggtctac tgcctcgggg aataatgcga caaggacttc agtgtaaaat atgtaaaatg 840	
	aatgtgcata ttcgatgtca agcgaaactg gccctcaact gtgggggtaaa tgcgggtggaa 900	
	cttgcgaaga ccctggcagg gatgggtctc caaccgggaa atattttccc aacctcgaaa 960	
	ctcgtttcca gatcgacctc aagacgcagc ggaaggagga gcagcaaaag aggaatatggg 1020	
25	atttgggtta attcttccaa ccgacttggg atcgacaact ttgagttcat cagagttgtg 1080	
	gggaaggggga gttttgggaa ggtgatgctt gcaagagtaa aagaacacagg agacctctat 1140	
	gctgtgaagg cctgtgaagaa ggaactgatt ctgctgggat atgatgtgga atgcaccagt 1200	
	accagagaaga ggatcctgtc tctggcccgc aatcaccctt tctcactca gttgtttctg 1260	
	tgccttcaga ccccgcacgc tctgtttttt gtgatggagt ttgtgaatgg gggtgaactg 1320	
30	atgttccaca tctcagaagtc tctgtctttt gatgaagcac gagctcgtct ctatgctgca 1380	
	gaaatcatatt cggctctcat gttcctccat gataaaggaa tcatctatag agactatgaa 1440	
	ctggacaatg tctctgttga ccacgagggt cactgtaaac tggcagactt ccgaatgtgc 1500	
	aaggaggaga tttgcaatgg tgtccaccag gccacattct tggcacgcc agactatata 1560	
	gctccagaga tctccagaga aatgctgtac gggcctgcag tagactggtg ggcaatgggc 1620	
35	gtgtgtgctc atgagatgct ctgtggtcac gcgccttttg aggcagagaa tgaagatgac 1680	
	ctcttttgagg ccatactgaa tgatgaggtg gtctacccta cctggctcca tgaagatgcc 1740	
	acagggatcc taaaaatctt catgacaag aaccccccca tgcgctctggg ccgctctgact 1800	
	cagggaaggcg agcacgccat ctgtgagacat ccttttttta aggaatcgca cggcgccagc 1860	
	ctgaaccatc gccaaataga accgcctttc agacaccagaa tcaaatcccg aagaagatgtc 1920	
40	agtaattttg accctgactt cataaaggaa gagccagttt taactccaat tgatgaggga 1980	
	catcttccaa tgattaacca ggatgagttt agaaactttt cctatgtgtc tccagaatgt 2040	
	caaccatag	2049
45	<210> 115	
	<211> 948	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
50	<300>	
	<302> PKC epsilon	
	<310> XM002370	
	<400> 115	
	atgttggcag aactcaaggc caaagatgaa gtatatgtgt tgaaggtctt aaagaaggac 60	
55	gtcatccttc aggatgatga cgtggactgc acaatgcagc agaagaggat ttbgctctctg 120	
	gcacggaaac acccgtacct tacccaactc tactgtcgtc tccagagaca ggacgccttc 180	
	ttttctgtca tggaaatagt aaatggtgga gactcctagt ttcagatcca ggctcccca 240	
	aaattogacg agcctcgttc aoggttctat gctcagacgc tccatcagcc cctcatgttc 300	
60	ctccaccagc atggagtcct ctacagggat atgtgaaactg acaacatctc tctggatgca 360	
	gaaggtcaact gcaagctcgg tgacttcggg atgctgacgg aagggtattct gaatgggtgt 420	
	acgaccacca cgttctgtgg gactcctgac tacatagctc ctgagatcct gcaggaggtg 480	

	gagtatggcc	cctccgtgga	ctgggtggcc	ctgggggtgc	tgatgtacga	gatgatggct	540
	ggacagccct	cctttgagcg	cgacaatgag	gacgacctat	ttgagtcocat	cctccatgac	600
	gacgtgtgtg	accagctctg	gctcagcaag	gaggctgtca	gcattcttgaa	agctttcatg	660
5	acgaagaatc	cccacaagcg	cctgggtctgt	gtggcatcgc	agaatggcga	ggacgccatc	720
	aagcagcacc	catctctcaa	agagattgac	tgggtgtccc	tggagcagaa	gaagatcaag	780
	ccacccttca	aaccacgctg	taaaaccaa	agagacgtca	ataattttga	ccaagacttt	840
	acccgggaag	agccggtact	cacccttgtg	gacgaagcaa	ttgtaaagca	gatcaaccag	900
	gaggaattca	aagggtttct	ctactttggt	gaagacctga	tgccctga		948
10	<210> 116						
	<211> 1764						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
15	<300>						
	<302> PKC iota						
	<310> NM002740						
20	<400> 116						
	atgtcccaca	cggtcgcagg	cgccggcgag	ggggaccatt	cccaccaggt	ccgggtgaaa	60
	gcctactacc	gccgggataat	catgataaca	catltttgaac	cttccatctc	ctttgagggc	120
	ctttgcaatg	aggtttcgaga	catgtgttct	tttgacaacg	aacagctctt	caccatgaaa	180
	tggtatagatg	aggaagggaga	cccgtgtaca	gtatcatctc	agttggagtt	agaagaagcc	240
25	tttagacttt	atgacgtaaa	caaggattct	gaactcttga	ttcatgtgtt	cccttgtgtg	300
	ccagaaacgtc	ctgggatgcc	ttgtccaggga	gaagataaat	ccatctaccg	tagagggtga	360
	cgccgctgga	gaagagcttta	ttgtgccaat	ggccacactt	tccaagccaa	cggttttcaac	420
	agcgctgtct	actgtgccat	ctgcacagac	cgaatatggg	gaactggagc	ccaaggatat	480
	aagtgcacat	actgcaaaact	cttggttcat	aagaagtgcc	ataaactcgt	cacaattgaa	540
30	tgtggggcgc	atctctttgc	acaggaacca	gtgatgccca	tggatcagtc	atccatgcat	600
	cttgaccatg	ccagacagct	aattccatat	aatccttcaa	gtcatgagag	tttggatcaa	660
	gttggtgaa	aaaaagaggc	aatgaacacc	agggaaagtg	gcaagacttc	atccagttcta	720
	ggctcttcagg	attttgattt	gctccgggta	ataggaagag	gaagttatgc	caaagtactg	780
	ttggttcgat	taaaaaaaac	agatcgtatt	tatgcaatga	aagttgtgaa	aaaagagctt	840
35	gttaaatgat	atgggataat	tgattgggta	cagacagaga	agcatgtgtt	tgagcaggca	900
	tccaatcatc	ctttccttgt	tgggtcgcat	tcttgctttc	agacagaaag	cagatgtttc	960
	tttgttatag	agtatgtaaa	tggaggagac	ctaattgttc	ataatgagcg	acaaagaaaa	1020
	cttcctgaag	aacatgccag	atltttactc	gcagaaatca	gtctagcatt	aaattatctt	1080
	catgtagcag	ggataaatat	tagagatttg	aaactggaca	atgtattact	ggacttgtgaa	1140
40	ggccacatga	aactccatga	ctacggcatg	tgtaaggaa	gattacggcc	agagatatac	1200
	accagcactt	cttgtgtgac	tcttaattac	attgtctctg	aaatttttaag	aggaagaagt	1260
	tatggtttca	gtgttgactg	gtgggtctct	ggagtgctca	gttttgagat	gatggcagga	1320
	aggtctccat	ttgatattgt	tggggagctc	gataaccctg	accagaacac	agaggattat	1380
	ctcttccaa	ttattttgga	aaaacaaat	cgcataccac	gtctctctgc	tgtaaaaagt	1440
45	gcaagtgttc	tgaagagttt	tcttaataag	gaacctaaag	aaagattggg	ttgtcatcct	1500
	caaacaggat	ttgctgatat	tcaggggacac	cggttctctc	gaattgttga	ttgggatatg	1560
	atggagcaaa	aacaggtggg	acctcccttt	aaaccaaata	tttctggggg	atttggtttg	1620
	gacaaacttt	attctcagtt	tactaatgaa	ctgtccagc	tcactccaga	tcagcatgac	1680
	attgtgagga	agattgatca	gtctgaattt	gaaggttttg	agtatatcaa	tcctcttttg	1740
50	atgtctgcag	aagaatgtgt	ctga				1764
	<210> 117						
	<211> 2451						
55	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> PKC mu						
60	<310> XM007234						
	<400> 117						

	atgtatgata	agatcctgct	ttttcgccat	gaccttacct	ctgaaaacat	ccttcagctg	60
	gtgaaagcgg	ccagtgtata	ccaggaaagg	gatcttattg	aagtggctct	gtcagctctc	120
	gccacctttc	aagactttca	gattcgtccc	cacgctctct	ttgttcatcc	atacagagct	180
5	ccagctttct	gtgatcactg	tggagaaatg	ctgtgggggg	tggtagctca	aggtctctaa	240
	tgtgaaaggt	gtggctctgaa	taccataaag	agatgtgcat	ttaaaatacc	caacaattgc	300
	agcggtgtga	ggcgggaaag	gctctcaaac	gtttccctca	ctggggctcag	caccatccgc	360
	acatcatctg	ctgaactctg	tacaagtgcc	cctgatgagc	cctctctcga	aaaatacaca	420
	tcagagtctg	ttattgtctc	agagaagagg	tcaaattctc	aatcacatca	tggacagaca	480
	ttaccctttg	acaagatttt	gatgtctaaa	gttaaagtgc	cgcacacatt	tgctatccac	540
10	ttctacaccc	ggcccacagt	gtgccagtac	tgcagaagcg	ttctgaaggg	gcttttcagg	600
	ggcggtctgc	agtgcacaa	ttgcagattc	aactgccata	aacgttgtgc	accgaaagta	660
	ccaaacaact	gccttggcga	agtgaccatt	aattggagatt	tgcttagccc	tggggcagag	720
	tctgatctgg	tcattggaag	aggagtgat	gacaaatgata	gtgaaaggaa	cagtgggctc	780
	atggatgata	tggagaagc	aatggtccaa	gatgcagaga	tggcaatggc	agagtgcacg	840
15	aacgacagtg	gcgagatgca	agatccagac	ccagaccacg	aggacgccaa	cagaaacctc	900
	agtcctacaa	caagcaacaa	tatcccactc	atgagggtag	tgcagctctg	caaacacacg	960
	aagaggaaaa	gcagcacagt	catgaaagaa	ggatggatgg	tcactacac	cagacaggaac	1020
	acgctgcgga	aacggcacta	ttggagattg	gatagcaaat	gtattaccct	ctttcagaat	1080
	gacacaggaa	gcggtacta	caaggaaatt	cctttatctg	aaattttgtc	tctggaacca	1140
20	gtaaaaactt	cagctttaat	tcctaatggg	gccaatctct	attgtttcga	aatcactacg	1200
	gcacatgtag	tgtattatgt	gggagaaaa	gtggtcaatc	cttccagccc	atacccaaat	1260
	aacagtgctc	tcaccagctg	cgttgggtga	gatgtggcca	ggatgtggga	gatagccctc	1320
	cagcatgcgc	tcattccacg	cattccctcg	ggctctctcg	tgggtacagg	accaactctg	1380
	ccagagata	tcctctgtgag	tatttcagta	tcaaattgcc	agattcaaga	aaatgtggac	1440
25	atcacacacg	tatatcactg	ttttcctgat	gaagtaactg	gttctggaca	gtttggaatt	1500
	gtttatggag	gaaaaacatc	taaaacagga	agagatgtag	ctattaaaa	cattgacaaa	1560
	ttacgatctc	caacaaaaca	agaaaagccg	aggttgcaat	aggttgcaat	ctacagaga	1620
	cttcatcacc	ctggtgttgt	aaatttggag	tgtatgtttg	agacgctcga	aagagtgttt	1680
	gttcttatgg	aaaaactcca	tggagacatg	ctggaaatga	tactctggcg	gttgccgaac	1740
30	aggttgccag	agcacataac	gaagttttta	attactcaga	taactctggc	tttggcgac	1800
	cttcatctta	aaaatatcgt	tcactgtgac	ctcaaacag	aaaatgtgtt	gctagctcca	1860
	gctgatcctt	ttctcaggt	gaaactttgt	gatttttgtt	ttcccggtat	cattggagag	1920
	aagtctttcc	ggaggtcagt	gggtgggtacc	cccgcttacc	tggctctcga	ggctctaagg	1980
	aaacagggct	acaatcgctc	tctagacatg	tggctctgtt	gggtcatcat	ctatgtgaag	2040
35	ctaaagcgca	cattccatt	taatgaagat	gaagacatac	acgaccaaat	tcagatgca	2100
	gctttctagt	atccaccaaa	tccttggaag	gaaatactc	atgaagccat	tgactcttat	2160
	accaatttgc	tgcaagtata	aatgagaaag	cgctacagtg	tggataagac	cttgagccac	2220
	ctttggctac	aggactatca	gacctgggtc	gattttcgag	agctggaaatg	caaaattcgg	2280
	ggcgctacac	tcaccocatg	aagtgtatgc	ctgaggtggg	agaagtatgc	agggcgagag	2340
40	gggctgcagt	accocacaca	cctgatcaat	ccaagtgtca	gccacagtgc	accctctgag	2400
	actgaaagaa	cagaaatgaa	agccctcggt	gagcgtgtca	gcatcctatg	a	2451

45 <210> 118
 <211> 2673
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

50 <300>
 <302> PKC nu
 <310> NM005813

400> 118
 atgtctgcga ataatctccc tccatcagcc cagaagtctg tattaccoc agctattcct 60
 gctgtgtctc cagctgtctc tccgtgttca agtcctaaga cgggactctc tgcocgactc 120
 tcaatttcgaa gcttccagtgc accatcactc accaactcca gaggctcagt gcatcactgt 180
 tcattctatc tgcaaatctg cctcacacgg ccatgtgtaa ccatggaagc cagggaactg 240
 gctttatctg ctgtcaagga tcttgtgtgc tccatagatt atcaaaaagt tccagagtgt 300
 ggattctttg gcatgtatga caaaattctt ctctttgcc atgacatgaa tccagaaaac 360
 attttgcagc tgattaccctc agcagatgaa atacatgaag gagactagt ggaagtgggt 420
 ctttcagctt tagccacagt caagagactc cagattcgtc cacatactct ctatgtacat 480
 tcttacaaga cctctacttt ctgtgattac tgggttgaga tgcctgctggg attggtacgt 540

	caaggactga	aatgtgaagg	ctgtggatta	aattaccata	aacgatgtgc	cttcaagatt	600
	ccaaataact	gtagtggaag	aagaaagaga	cgtotgtcaa	atgtatcttt	accaggacc	660
	ggcctctacg	ttccaagacc	ctacagcct	gaatatgtag	cccttccagc	tgaagagtca	720
	catgtccacc	aggaaccacg	taagagaatt	cottctctgga	gtggctcgcc	catctggagt	780
5	gaaagatgg	taatgtgcag	agtgaagtt	ccacacacat	ttgctgttca	cctttacacc	840
	cgctccacga	tatgtcagta	ctgcaagcgg	ttactgaag	gctctttctg	ccaagaaatg	900
	cagtgtaagg	attgcaaat	caactgcca	aaacgctgtg	catcaaaagt	accagagacc	960
	tgccttggag	agggttacttt	caatggagaa	ccttccagtc	tgggaacaga	tacagatata	1020
	ccaatggata	ttgacaataa	tgacataaat	agtgatagta	gtcgggggtt	ggatgacaca	1080
10	gaagagccat	cacccccaga	agataaagat	ttcttctgtg	atccatctga	tctcgatgtg	1140
	gaagagagat	aagaagccgt	taaaaacaat	agtcocatca	caagcaataa	tattcccgcta	1200
	atgaggggtt	tacaatccat	caagcacaca	aagaggaaga	gcagcacaa	gggtgaaggaa	1260
	gggtggatgg	tcatttacac	cagcagggat	aacctgagaa	agaggcatta	ttggagactt	1320
	gacagcaaat	gtctaacatt	atttcagaat	gaatctggat	caaagtatta	taaggaaatt	1380
15	ccactttcag	aaattctccg	catatcttca	ccacgagatt	tcacaaaact	ttcacaaagg	1440
	agcaatccac	actgttttga	aatcattact	gatactatgg	tatacttcgt	tgggtgagaac	1500
	aatggggaga	gctctcataa	tctgttctct	gctgccactg	ggagtggact	tgatgtagca	1560
	cagagctggg	aaaaagcaga	tgcaccaagc	ctcatgcctg	ttactctcca	acaggaattt	1620
	tgcactcttc	cagggcaagg	gaagagcac	aaagatttgt	ctacaaagat	ctctgtatct	1680
20	aatgttcaga	ttcaggagaa	tgtggatctc	agtaactgtt	accagatctt	tgcagatgag	1740
	gtgcttgggt	caggccaggt	tggcatcggt	tatggaggaa	aacatagaaa	gactgggagg	1800
	gatgtgggta	ttaaagtta	tgataaagat	agatctccca	caaaaacaga	aagtcacact	1860
	cgtaatgaag	ttggctatctt	acagaatttg	caccatccgt	ggattgttaa	cttggaaatg	1920
	atgtttgaaa	ccccagaacy	agcttttgta	gtaattggaa	agctgcactg	agatatgttg	1980
25	gaatgatctc	tatccagata	gaaaagtcgg	cttccagaa	gaattactaa	atctatggct	2040
	acacgatact	ttgtgtgctt	gaggaaatctg	cattttaaga	atatgtgtga	ctgtgttgta	2100
	agccacagaaa	atgtgtctgct	tgcatacgca	gagccatttc	ctcaggtgaa	ctgtgttgac	2160
	tttggatttg	cacgcatact	tgggtgaaaag	tcatttcagga	gatctgtggt	aggaactcca	2220
	gcataacttag	ccctctgaagt	tctccggagc	aaaggtttaca	accgttccct	agcatatgtg	2280
30	tcagtgggag	ttatcatctc	tgtgagcctc	agtggcacat	ttccttttaa	tggaggtgaa	2340
	gatataaact	accacatcca	aaatgctgca	tttatgtacc	ccaccaatcc	atggagagaa	2400
	attctctgtg	aagcaatgta	tctgataaac	aatctgtctc	aagtgaagat	gagaaaaactg	2460
	tacagtgttg	acaaactctct	tagtcatccc	tggctacagg	actatcagac	ttggctgtgac	2520
	cttagagaa	ttgaaactcg	cattggagaa	cgttacatta	cacatgaaag	tgatgtatgt	2580
35	cgtgggaaa	tacatgcata	cacacataac	cttgtatacc	caaagcactt	cattatgggt	2640
	cctaataccag	atgatatgga	agaagatcct	taa			2673
40	<210>	119					
	<211>	2121					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
45	<300>						
	<302>	PKC tau					
	<310>	NM006257					
50	<400>	119					
	atgtcgccat	ttcttcggat	tggcttggcc	aactttgact	gcgggtctctg	ccagtcttgt	60
	caggcgagag	ctgttgaacc	ttactgtgct	gtgctcgtca	agagtatgtg	cgaatcagag	120
	aacggcgatga	tgtatatacca	gaaaagccct	accatgtacc	cacccctggga	cagcaactttt	180
	gagtgccata	tcacacaaagg	aaagtcctatg	cagatcattg	tgaaggccaa	aaacgtggac	240
	ctcatctctg	aaaccacccgt	ggagctctac	tgcgtggctg	agaggtgcag	gaagaaacaac	300
	gggaaagacag	aaatatgggtt	agagctgaaa	cctcaaggcc	gaatgctaat	gaatgcaaga	360
55	tactttctg	aaactgagtg	cacaaaggac	atgaatgaat	ttgagcagga	agggcttttt	420
	gctttctgctc	agcgtcgggg	tgccatcaag	caggcaaaag	tcacacccgt	caagtgcacc	480
	ggatgtcactg	ccactctctt	cccacagccc	acatttttgt	ctgtctgcc	cgagtttgtc	540
	tggtggcctga	acaaacacggg	ctaccagtcg	cgacaatgca	atgcagcaat	tccaaagag	600
	tgtattgata	aagttatagc	aaagtgcaca	ggatcatgca	tcaatagccg	agaaacacatg	660
60	ttccacaagg	agagatgcaa	aatgcaactg	ccacacagat	ttaaagtcta	caattacaag	720
	agcccgagag	ctgttgaaaca	ctgtgggacc	ctgctgtggg	gactgggacc	cgcaaggact	780
	aagtgtgatg	catgtgggat	gaatgtgcat	catagatgcc	agacaaaggt	ggccaaacctt	840

	ccagacgatg	aggatgccat	aaagaggatc	gaccagtcag	agttcgaagg	ctttgagtat	1740
	atcaacccat	tattgtctgc	caccgaggag	tcggtgtga			1779
5	<210> 121						
	<211> 576						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
10	<300>						
	<302> VEGF						
	<310> NM003376						
15	<400> 121						
	atgaactttc	tgetgtcttg	ggtgcattgg	agcettgcct	tgetgtctta	cctccaccat	60
	gccaaagtgt	cccaggctgc	acccatggca	gaaggaggag	ggcagaatca	tcacgaagtg	120
	gtgaagtcca	tggtgtctta	tcagcgcagc	tactgcccac	caatcgagac	cctggtggag	180
	atcttccagg	agtaccctga	tgagatcgag	tacatcttca	agccatcctg	tgtgcccctg	240
	atgcgatcgg	ggggctgctg	caatgacgag	ggcctggagt	gtgtgccac	tgaggagtcc	300
20	aacatcacca	tcgagattat	gcggatcaaa	cctcaccaag	gccagcacat	aggagagatg	360
	agcttctctac	agcacacaac	atgtgaatgc	agaccaaaga	aagatagagc	aagacaagaa	420
	aatccctgtg	ggccttgctc	agagcggaga	aagcatttgt	ttgtacaaga	tccgcagacg	480
	tgtaaatgct	cctgcacaaa	cacagactcg	cgttgcaagg	cgaggcagct	tgagttaaac	540
	gaacgtactt	gcagatgtga	caagccgagg	cgggtga			576
25							
	<210> 122						
	<211> 624						
	<212> DNA						
30	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> VEGF B						
	<310> NM003377						
35	<400> 122						
	atgagccctc	tgetccgcgg	cctgctgtgc	gcgcactccc	tgcagctggc	ccccgccagg	60
	gccctctgtc	cccagcctga	tgcctctggc	caccagagga	aagtgtgtgc	atggatagat	120
	gtgtatactc	gcgcctacctg	ccagcccccg	gaggtgggtg	tgccttgac	tgtggagtgc	180
40	atggggcacg	tgcccaaaaa	gctgggtccc	agctgcgtga	ctgtgcagcg	ctgtgggtgc	240
	tgctgcccct	acgatggcct	ggagtgtgtg	cccactggcg	agcaccgaat	ccggatcgag	300
	atcctcatga	tcgggtaccc	gagcagtcag	ctggggggaga	tgtcccctgga	agaaacacag	360
	cagtggtgaat	gcagaccta	aaaaaaggac	agtgtctgtga	agccagacag	ggctgccact	420
	cccacacccc	gtccccagcc	ccgttctgtt	ccgggctggg	actctgcccc	cggagcaccc	480
45	tccccagctg	acatcaccca	tcccactcca	gccccaggcc	cctctgcccc	cgtctgcccc	540
	agcaccaaca	gcgccctgac	ccccggacct	gcgcgcccg	ctgccgagcg	cgcagcttcc	600
	tccgttgcca	agggcggggc	ttag				624
50	<210> 123						
	<211> 1260						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
55	<300>						
	<302> VEGF C						
	<310> NM005429						
60	<400> 123						
	atgcacttgc	tgggcttctt	ctctgtggcg	tgttctctgc	tgcgcgctgc	gtgtctcccg	60
	ggctctctcg	aggcgccgcg	cgccgcccgc	gcctctcgagt	cgggactcga	cctctcgagc	120
	gcggagcccg	acgcggggca	ggccacgctt	tatgcaagca	aagatctgga	ggagcagtta	180

	cggtctgtgt	ccagttgtaga	tgaactcatg	actgtactct	accagaata	tgggaaatg	240
	tacaagtgtc	agctaaggaa	aggaggtcgg	caacataaca	gagaacaggc	caacctcaac	300
	tcaaggacag	aagagactat	aaaatttgct	gcagcacatt	ataatacaga	gatcttgaaa	360
	agtattgata	atgagtggag	aaagactcaa	tgcatgcccac	gggaggtgtg	tatagatgtg	420
5	gggaaggagt	ttggagtcgc	gacaaacacc	ttctttaaac	ctccatgtgt	gtccgtctac	480
	agatgtgggg	gttgctgcaa	tagtgagggg	ctgcagtgca	tgaacaccag	cagagcttac	540
	ctcagcaaga	cgttatttga	aattacagtg	ctctctctct	aaggccccaa	accagtaaca	600
	atcagttttg	ccaatcacac	ttcctgcgga	tgcatgtcta	aactggatgt	ttacagacaa	660
	gttcattcca	ttatttagacg	ttcctgcga	gcaacactac	cacagtgtca	ggcagcgaa	720
10	aagacctgcc	ccaccaatta	catgtggaat	aatcacatct	gcagatgcct	ggctcaggaa	780
	gatttttatgt	tttctcgga	tgctggagat	gactcaacag	atggattcca	tgacatctgt	840
	ggaccaaaac	aggagctgga	tgaagagacc	tgctcagtg	ctgcagagc	ggggcttcgg	900
	ctgcccagct	gtggacccca	caagaacta	gacagaaact	catgccagtg	tgtctgtaaa	960
	aacaaactct	tccccagcca	atgtggggcc	aacogagaat	ttgatgaaaa	cacatgccag	1020
15	tgtgtatgta	aaagaacctg	ccccagaat	caacccctaa	atccctgaaa	atgtgcctgt	1080
	gaatgtacag	aaagtccaca	gaaatgcttg	ttaaaaggaa	agaagttcca	ccacaaaaa	1140
	tgccagctgt	acagacggcc	atgtacgaac	cgccagaagg	cttgtgagcc	aggattttca	1200
	tatagtgaag	aagtgtgtcg	ttgtgtccct	tcattatgga	aaagaccaca	aatgagctaa	1260
20							
	<210> 124						
	<211> 1074						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
25							
	<300>						
	<302> VEGF'D						
	<310> AJ00185						
30							
	<400> 124						
	atattcaaaa	tgtacagaga	gtgggtagt	gtgaatgttt	tcattgatgt	gtacgtccag	60
	ctgggtgagg	gtccacagtaa	tgaacatgga	ccagtgaagc	gatcatctca	gtccacattg	120
	gaacgatctg	aacagcagat	cagggtcgtc	tctagtttgg	aggaaactac	tcgaattact	180
	cactctgagg	actggaagct	gtggagatgc	aggctgaggg	tcaaaaagttt	taccagtagt	240
35	gactctcgct	cagcatccca	tcggtccact	aggtttgccg	caactttcta	tgacattgaa	300
	acactaaaa	ttatagatga	agaatggcaa	agaactcagt	gcagccctag	agaaactgtc	360
	gtggagtggt	ccagtgagct	ggggaagagt	accaaaccat	tcttcaagcc	cccttggtgtg	420
	aaactgtttc	gatgtggtgg	ctgttgcaat	gaagagagcc	ttatctgtat	gaacacctag	480
	acctcgta	tttccaaaca	gctctttgag	atatcagtc	ctttgacatc	agtaacctgaa	540
40	ttagtgcctg	ttaaagtgtc	caatcataca	gggtgttaagt	gcttgccaac	agccccccgc	600
	catccatcat	caattatcag	aagatccatc	cagatccctg	aagaagatcg	ctgttcccat	660
	tccaagaatac	ctctgtccat	tgacatgcta	tgggatatga	acaaatgtaa	atgtgttttg	720
	caggaggaaa	atccacttgc	tggaaacagaa	gaccactctc	atctccagga	accagctctc	780
	tgtggggcac	acatgatgtt	tgaagaaagt	cgttgccagt	gtgtctgtaa	aacacocatg	840
45	cccaagaatg	taattccagca	ccccaaaaac	tgcagttgct	ttgagtgcga	agaaagtctg	900
	gagacctgct	ccagagaagca	caagctattt	caccacagaca	ctctgagctg	tgaggacaga	960
	tgccctcttc	ataccagacc	atgtgcaagt	ggcaaaacag	catgtgcgaa	gcattggccg	1020
	tttccaaagg	agaaaagggc	tgcccagggg	ccccacagcc	gaagaatcc	ttga	1074
50							
	<210> 125						
	<211> 1314						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
55							
	<300>						
	<302> B2F						
	<310> M96577						
60							
	<400> 125						
	atggccttgg	cgggggcccc	tgccggcgcc	ccatgcgcgc	eggcgctgga	ggccctgtct	60
	ggggcccgcc	cgctcgccgt	gctcgactcc	tcgcagatcg	tcattcatctc	cgccggcgag	120

	gacgccagcg	ccccgccggc	tcccacccgc	ccgcggcgcc	ccgcggcgcc	ccccgcgac	180
	cctgacctgc	tgctctttgc	cacaccgcag	ggccccccgc	ccacaccag	tgccgcggcg	240
	ccgcgcctcg	gcgcgccgcc	ggtgaagcgg	aggctggacc	tggaacctga	ccatcagtag	300
	ctggccgaga	gcagtgggcc	agctcggggc	agaggccgcc	atccaggaaa	aggtgtgaaa	360
5	tccccggggg	agaagtcaag	ctatgagacc	tcaactgaatc	tgaccaccaa	gcgtctcccg	420
	gagctgctga	gccactcggc	tgacggtgtc	gtcgacctga	actgggctgc	cgaggtgtcg	480
	aaggtgcaga	agcggcgcat	ctatgacatc	accaacgtcc	ttgagggcat	ccagctcatt	540
	gccagaagtg	ccaagaacca	catccagtgg	ctgggcagcc	acaccacagt	ggcgctcgcc	600
	ggacggcttg	aggggttgac	ccaggacctc	cgacagctgc	aggagagcga	gcagcagctg	660
10	gaccacctga	tgaatatctg	tactacgcag	ctgcgcctgc	tctccgagga	cactgacagc	720
	cagcgccttg	cctacgtgac	gtgtcaggac	cttcgtagca	ttgcagaccc	tgacagcagc	780
	atggttatgg	tgatcaaaag	ccctcctgag	accagctcc	aagccgtgga	ctcttcggag	840
	aactttcaga	tctcccttaa	gagcaaacaa	ggcccagatc	atgttttctc	gtgcccctgag	900
	gagaccgtag	gtgggatcag	ccctgggaag	accccatccc	aggaggtcac	ttctgaggag	960
15	gagaacaggg	ccactgactc	tgcccaccata	gtgtcaccac	caccatcacc	tccccctcca	1020
	tccctcacca	cgatcccgag	ccagtcctta	ctcagcctgg	agcaagaacc	gctgttgtcc	1080
	cggatgggca	gcctcggggc	tcccgtggac	gaggaccgcc	tgcccccgct	ggtggcgggc	1140
	gagctgcctc	tgagcatctg	gcgggaggag	ttctccggcc	tctccctcga	ggagttccat	1200
	agcctttccc	caccccacga	ggccctcgac	taccacttcg	gcctcgaggga	gggcgagggc	1260
20	atcagagacc	tcttcgactg	tgactttggg	gacctcacc	ccctggattt	ctga	1314
	<210> 126						
	<211> 166						
25	<212> DNA						
	<213> Human papillomavirus						
	<300>						
	<302> EBER-1						
30	<310> Jo2078						
	<400> 126						
	ggacctacgc	tgccctagag	gttttgctag	ggaggagacg	tggttggtcg	tagccaccgc	60
	tcccggttac	aagtcccgcc	tggtgaggac	ggtgtctgtg	gttgtcttcc	cagactctgc	120
35	ttttcgccgt	cttcgggtcaa	gtaccagctg	gtggtcccca	tggttt		166
	<210> 127						
	<211> 172						
40	<212> DNA						
	<213> Hepatitis C virus						
	<300>						
	<302> EBER-2						
45	<310> J02078						
	<400> 127						
	ggacagccgt	tgccctagtg	gtttcggaca	caccgccaac	gctcagtgcc	gtgctaccga	60
	cccgaggtca	agtcccgccg	gaggagaaga	gaggcttccc	gcctagagca	tttgcaagtc	120
50	aggattctct	aatccctctg	ggagaagggt	attcggcttg	tccgctattt	tt	172
	<210> 128						
	<211> 651						
55	<212> DNA						
	<213> Hepatitis C virus						
	<300>						
	<302> NS2						
60	<310> AJ238799						
	<400> 128						

	cctctcgtca	aaactgaagg	gatctgcagg	aatcgtgtga	ctaataatgt	aaaaagcgtc	120
	actaaattgg	tggcaaatct	tccaaaagac	tacatgataa	ccctcaaat	tgtccccggg	180
	atggaattgt	tgccaaagtca	ttgttggata	agcgagatgg	tagtacaatt	gtcagacagc	240
	ttgactgac	ttctggacaa	gttttcaaat	atttctgaag	gcttgagtaa	tatttccatc	300
5	atagacaaac	ttgtgaatat	agtcgatgac	ctttgtggagt	gcgtcaaaag	aaactcatct	360
	aaggatctaa	aaaaatcatt	caagagccca	gaaccaggc	tctttactcc	tgaagaattc	420
	tttagaattt	ttaatatagtc	catgtatgcc	ttcaaggact	ttgtagtggc	atctgaaact	480
	agtgattgtg	tgtttttctc	aacattaagt	cctgagaaag	attccagagt	cagtgtccaa	540
	aaacaccatt	tgtttacccc	tgttcgagcc	agctccctta	ggaatgacag	cagttagcagt	600
10	aatagggaag	ccaaaatctc	ccctggagac	tccagcctac	actgggcagc	cattggcattg	660
	ccagcatgtg	ttctctctat	aattggcttt	gcttttggag	ccttatactg	gaagaagaga	720
	cagccaagtc	ttacaagggc	agttgaaat	atacaaat	atgaagagga	taatgagata	780
	agtatgttgc	aagagaaaga	gagagagttt	caagaagtgt	aa		822
15	<210> 135						
	<211> 483						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
20	<300>						
	<302> TGFalpha						
	<310> AF123238						
25	<400> 135						
	atgggtcccc	cggttgagca	gctgcacctg	ttogetctgg	gtattgtgtt	ggctgctgtc	60
	caggcccttg	agaaacagca	gtcccccgtg	agtgacagcc	gcgccgtggc	tcagcagtg	120
	gtgtcccat	ttaatgactg	cccagattcc	cacactcagt	tctgtctcca	tggaaacctc	180
	aggtttttgg	tgcaggagga	caagccagca	tgtgtctgcc	atctctggga	cgttgggtga	240
30	cgctgtgagc	atgcggacct	cctggccgtg	gtggctgcca	gccagaagaa	gcagggccatc	300
	accgccttgg	tgtgtgtctc	catcgtggcc	ctggctgtcc	tatcatcac	atgtgtgtgtg	360
	atacactgct	gccaggtccg	aaaacactgt	gagtggtgcc	gggcctcat	ctgcgggcac	420
	gagaagccca	gcgcctctct	gaaggggaaga	accgtctgtc	gccactcaga	aacagtggtc	480
	tga						483
35	<210> 136						
	<211> 1071						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
40	<300>						
	<302> GD3 synthase						
	<310> NM003034						
45	<400> 136						
	atgagccccc	gcgggcgggc	cgggcgacaa	acgtccagag	gggccatggc	tgtactggcg	60
	tggaaagtcc	cgcgagcccg	gctgcccattg	ggagccagtg	ccctctgtgt	cgtggctctc	120
	tgttggtctc	acatcttccc	cgtctacccg	ctgcaccaag	agaaaagagt	cgtgcagggg	180
50	gtgctgcaac	agggcacggc	gtggaggagg	aaccagacgc	cgccagagag	gttcaggaaa	240
	caaatggaag	actgtcgcga	ccctgcccat	ctcttttcta	tgaactaaaat	gaattccccc	300
	atgggggaaga	gcattgtgta	tgaaggaggag	tttttatact	cattcaaccat	tgacaattca	360
	acttaactctc	tcttcccaca	ggcaacccca	ttccagctgc	cattgaagaa	atgcggcggtg	420
	gtggggaagt	gtgggattct	gaagaagagt	ggctgtgggc	gtcaaataga	tgaagcaaat	480
55	tttgtctatgc	gatgcaatct	ccctcctttg	tcaagtgaat	acactaagga	tgattggatcc	540
	aaaagtcaagt	tagtgacagc	taatcccagc	ataatttcgc	agaggtttca	ggaacctctg	600
	tgggtccagaa	agacatttgt	ggcaaacatg	aaaattctata	accacagtta	catctacatg	660
	cctgcctcttt	ctatgaagac	aggaacagag	ccattcttga	gggttttata	tacactgtga	720
	gatgtttgggt	ccaatcaaac	agtgctgttt	gcaaacccca	actttctgag	tagcatttga	780
60	aagttctggga	aaagttagagg	aatccatgcc	aagcgcctgt	ccacaggagt	tttctctgtg	840
	agcgagctc	tgggtctctg	tgaagaggtg	gcacatctatg	gcttctgggc	cttctctgtc	900
	aatatgcgatg	agcagcccat	cagcaccac	tactatgaca	acgtcttacc	ctttctctggc	960

[illegible]


```

gagagcttca ggtctggggg agagacaaca actccccctc agaagcagga gccgatagac 1440
aaggaaactgt atcctttaac ttccctcagg tcactctttg gcaacgaccc ctcgtcacaa 1500
taa 1503

5
<210> 139
<211> 1101
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus

10
<300>
<302> TARBP2
<310> NM004178

15
<400> 139
atgagtgaaag aggagcaagg ctccggcact accacgggct gggggctgcc tagtatagag 60
caaatgtctgg ccgccaaccc aggcaagacc ccgatcagcc ttctgcagga gtatgggacc 120
agaataggga agacgcctgt gtacgacctt ctcaaaagcc agggccaagc ccaccagcct 180
aatttcacct tcctgggtcac cgttggcgac accagctgca ctggtcaggg ccccgcaag 240
aaggcagcca agcacaaggc agctgagggt gccctcaaac acctcaaaag ggggagcatg 300
ctggagccgg ccttgaggga cagcagttct tttctcccc tagactcttc actgcctgag 360
gacattccgg tttttactgc tgcagcagct gctaccccag ttccatctgt agtccctaacc 420
aggagccccc ccatggaact gcagccccc gtctccccct agcagtctga gtgcaacccc 480
gttggtgctc tgcaggagct ggtggtgcag aaaggctggc ggttgccgga gtacacagtg 540
accaggagt ctgggccagc ccacgcgcaa gaattcacca tgacctgtcg agtgggagct 600
ttcattgaga ttgggagtggt cacttccaaa aattggcaa agcggaatgc ggcggccaaa 660
atgctgcttc gagtgcacac ggtgcctctg gatgcccggg atggcaatga ggtggagct 720
gatgatgacc actctccatc ttgtgtgggc ttccgctcgt atggctcttc aaaccggggc 780
ccaggttgca cctgggattc tctacgaaat tcagtaggag agaagatcct gtccctccgc 840
agttgctccc tgggctccct ggtgcccctg gccctgctgt gctgccgtgt cctcagtgag 900
ctctctgagg agcaggcctt tcacgtcagc tacctggata ttgaggagct gacctcagtg 960
ggaactctgcc agtgccctgt ggaactgtcc accagccgg ccactgtgtg tcatggctct 1020
gcaaccacca gggagcgagc ccgtggtgag gctgcgccgc gtgccttgca gtacctcaag 1080
atcatggcag gcagcaagtg a 1101

35
<210> 140
<211> 219
<212> DNA
<213> Human immunodeficiency virus

40
<300>
<302> TAT (HIV)
<310> U44023

45
<400> 140
atggagccag tagatcctag cctagagccc tgggaagcgc caggaaagtc gcctaagact 60
gctgttacca ctgtctattg taaagagtgt tgctttcatt gccagtttg ttccataaca 120
aaaggcttag gcattctcta tggcaggaag aagcggagac agcgacgaag aactcctcaa 180
ggtcatcaga ctaatcaagt ttctctatca aagcagtaa 219

50
<210> 141
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

55
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sense-Strang
(R1A) einer dsRNA, die homolog zur MDR-1-Sequenz
ist

60

```

- <400> 141
ccaucucgaa aagaaguuaa ga 22
- 5 <210> 142
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
- 10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (R1B) einer dsRNA, die
komplementär zur MDR-1-Sequenz ist
- 15 <400> 142
ucuaaacuuc uuuucgagau gguu 24
- 20 <210> 143
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
- 25 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(R2A) einer dsRNA, die homolog zur MDR-1- Sequenz
ist
- 30 <400> 143
uauagguucc aggcugcug ua 22
- 35 <210> 144
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
- 40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(R3A) einer dsRNA, die homolog zur Sequenz des MDR
1-Gens ist
- 45 <400> 144
ccagagaagg ccgcaccugc au 22
- 50 <210> 145
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
- 55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (R3B) einer dsRNA, die
komplementär zur MDR-1-Sequenz ist
- 60 <400> 145
augcaggugc ggccuucucu ggcu 24
- <210> 146
<211> 21

<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

5 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(R4A) einer dsRNA, die homolog zur MDR-1-Sequenz
ist

10 <400> 146
ccaucucgaa aagaaguuaa g 21

<210> 147
<211> 21
15 <212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
20 antisense-Strang (R4B) einer dsRNA, die
komplementär zur MDR-1-Sequenz ist

<400> 147
25 uaacuucuuu ucgagauggg u 21

<210> 148
<211> 22
<212> RNA
30 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(S1A) einer dsRNA, die homolog zur YFP- bzw.
35 GFP-Sequenz ist

<400> 148
ccacaugaag cagcagcagu uc 22

40 <210> 149
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

45 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S1B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

50 <400> 149
gaagucgugc ugcuucaugu gg 22

55 <210> 150
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

60 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S7A) einer dsRNA, die homolog

zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

5 <400> 150
ccacaugaag cagcagcagu u 21

<210> 151
<211> 21
<212> RNA
10 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S7B) einer dsRNA, die
15 komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

<400> 151
gucgugcugc uucauguggu c 21

20 <210> 152
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

25 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (R2B) einer dsRNA, die
komplementär zur MDR-1-Sequenz ist

30 <400> 152
uacagcaagc cuggaaccua uagc 24

35 <210> 153
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

40 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(K1A) einer dsRNA, die homolog zur 5'-UTR der
Neomycin-Sequenz ist

45 <400> 153
acaggagag gaucguuucg ca 22

50 <210> 154
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (K1B) einer dsRNA, die
komplementär zur 5'-UTR der Neomycin-Sequenz ist

60 <400> 154
ugcgaaacga uccucauccu gu 22

5 <210> 155
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
 (K3A) einer dsRNA, die homolog zur 5'-UTR der
 Neomycin-Sequenz ist

10 <400> 155
 gaugaggaucau guuucgcaug a 21

15 <210> 156
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

20 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 antisense-Strang (K3B) einer dsRNA, die
 komplementär zur 5'-UTR der Neomycin-Sequenz ist

25 <400> 156
 augcgaaacg accucaucc u 21

30 <210> 157
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

35 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
 (K2A) einer dsRNA, die homolog zur 5'-UTR der
 Neomycin-Sequenz ist

40 <400> 157
 acaggauagag gaucguuucg caug 24

45 <210> 158
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

50 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
 antisense-Strang (K2B) einer dsRNA, die
 komplementär zur 5'-UTR der Neomycin-Sequenz ist

55 <400> 158
 ugcgaaacga uccucauccu gucu 24

60 <210> 159
 <211> 24
 <212> RNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S4B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP-bzw. GFP-Sequenz ist

5 <400> 159
gaagucgugc ugcuucaugu gguc 24

<210> 160
10 <211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
15 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(PKC1 A) einer dsRNA, die homolog zur
Proteinkinase C-Sequenz ist

<400> 160
20 cuucuccgcc ucacaccgc gcaa 24

<210> 161
25 <211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
30 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (PKC2 B) einer dsRNA, die
komplementär zur Proteinkinase C-Sequenz ist

<400> 161
35 gcagcggugu gagcgaggaga ag 22

<210> 162
40 <211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
45 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S12B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

<400> 162
aagucgugcu gcuucaugug g 21

50 <210> 163
<211> 23
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (S11B) einer dsRNA, die
komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

60 <400> 163
aagucgugcu gcuucaugug guc 23

```

<210> 164
<211> 20
5 <212> RNA
  <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
10 (S13A) einer dsRNA, die homolog zur YFP- bzw.
   GFP-Sequenz ist

<400> 164
ccacaugaag cagcagcagu 20

<210> 165
<211> 22
<212> RNA
20 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
25 antisense-Strang (S13B) einer dsRNA, die
   komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

<400> 165
agucgugcug cuucauggg uc 22

<210> 166
<211> 20
<212> RNA
30 <213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
35 antisense-Strang (S14B) einer dsRNA, die
   komplementär zur YFP- bzw. GFP-Sequenz ist

40 <400> 166
   agucgugcug cuucauggg 20

<210> 167
<211> 24
<212> RNA
45 <213> Künstliche Sequenz

<220>
50 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
   (S4A) einer dsRNA, die homolog zur YFP- bzw.
   GFP-Sequenz ist

55 <400> 167
   ccacaugaag cagcagcagu ucuu 24

<210> 168
<211> 21
<212> RNA
60 <213> Künstliche Sequenz

```

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(ES-7A) einer dsRNA, die homolog zur humanen
EGFR-Sequenz ist

5

<400> 168
aacaccgcag caugcaaga u 21

10

<210> 169
<211> 21
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

15

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (ES-7B) einer dsRNA, die
komplementär zur humanen EGFR-Sequenz ist

20

<400> 169
cuugacaugc ugcgguguuu u 21

25

<210> 170
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

30

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(ES-8A) einer dsRNA, die homolog zur humanen
EGFR-Sequenz ist

35

<400> 170
aaguuaaaaa ucccugcgu au 22

40

<210> 171
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

45

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (ES-8B) einer dsRNA, die
komplementär zur humanen EGFR-Sequenz ist

50

<400> 171
ugauagcgac gggaauuuua ac 22

55

<210> 172
<211> 22
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

60

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: sense-Strang
(ES-2A) einer dsRNA, die homolog zur humanen
EGFR-Sequenz ist

<400> 172
agugugaucc aagcuguccc aa 22

5 <210> 173
<211> 24
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz

10 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
antisense-Strang (ES-5B) einer dsRNA, die
komplementär zur humanen EGFR-Sequenz ist

15 <400> 173
uugggacagc uuggaucaca cuuu 24

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/055693 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12N 15/11,
A61K 31/713, C12N 15/88, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00152

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Januar 2002 (09.01.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 00 586.5 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE
101 55 280.7 26. Oktober 2001 (26.10.2001) DE
101 58 411.3 29. November 2001 (29.11.2001) DE
101 60 151.4 7. Dezember 2001 (07.12.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): RIBOPHARMA AG [DE/DE]; Universitätsstrasse
30, 95447 Bayreuth (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KREUTZER, Roland

[DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).
LIMMER, Stephan [DE/DE]; Universitätsstrasse 30,
95447 Bayreuth (DE). ROST, Sylvia [DE/DE]; Univer-
sitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). HADWIGER,
Philipp [DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth
(DE).

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nügelbachstrasse 49a,
91052 Erlangen (DE).

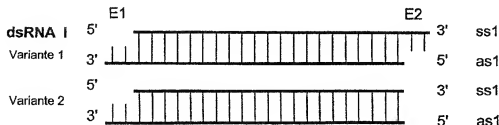
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES ZIELGENS



(57) Abstract: The invention relates to a method for inhibiting the expression of a target gene in a cell, comprising the following steps: introduction of an amount of at least one dual-stranded ribonucleic acid (dsRNA I) which is sufficient to inhibit the expression of the target gene. The dsRNA I has a dual-stranded structure formed by a maximum of 49 successive nucleotide pairs. One strand (as1) or at least one section of the one strand (as1) of the dual-stranded structure is complementary to the sense strand of the target gene. The dsRNA has an overhang on the end (E1) of dsRNA I formed by 1 - 4 nucleotides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte: Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge, wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Sinn-Strang des Zielgens ist, und wobei die dsRNA am einen Ende (E1) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

WO 02/055693 A3



OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

17. Juli 2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 02/00152

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-240
Y	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ;JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12 February 1998 (1998-02-12) the whole document	1-240
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW ()) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document	1-240
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3 August 2000 (2000-08-03) the whole document	1-240
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be constituted to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 January 2003

Date of mailing of the international search report

27/01/2003

Name and mailing address of the ISA

 European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Armandola, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/00152

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 1, 31 March 2000 (2000-03-31), pages 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 the whole document	1-240
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, NA, US, vol. 101, no. 3, 28 April 2000 (2000-04-28), pages 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 figure 1	1-240
Y	UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, US, vol. 90, no. 4, 1 June 1990 (1990-06-01), pages 543-584, XP000141412 ISSN: 0009-2665 the whole document	20-30, 60-70, 99-109, 140-150, 180-190, 219-229
Y	PARRISH S., FLEENOR J., ET AL.: "Functional Anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference." MOL. CELL, vol. 6, November 2000 (2000-11), pages 1077-187, XP002226361 the whole document	1-240
Y,P	AMBROS VICTOR: "Dicing up RNAs" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE,, US, vol. 293, no. 5531, 3 August 2001 (2001-08-03), pages 811-813, XP002183122 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-240

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/00152

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y,P	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, vol. 15, no. 2, 15 January 2001 (2001-01-15), pages 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 the whole document -----	1-240
A	WO 94 01550 A (AGRAWAL SUDHIR ;HYBRIDON INC (US); TANG JIN YAN (US)) 20 January 1994 (1994-01-20) -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/00152

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0044895	A	03-08-2000	DE 19956568 A1
			AT 222953 T
			AU 3271300 A
			WO 0044895 A1
			DE 10080167 D2
			DE 50000414 D1
			EP 1144623 A1
WO 9805770	A	12-02-1998	EP 1214945 A2
			19-06-2002
WO 9932619	A	01-07-1999	DE 19631919 A1
			12-02-1998
			WO 9805770 A2
			12-02-1998
			EP 0918853 A2
			02-06-1999
WO 0044914	A	03-08-2000	07-02-2002
			AU 743798 B2
			12-07-1999
			AU 1938099 A
			01-07-1999
			CA 2311999 A1
WO 9401550	A	20-01-1994	EP 1042462 A1
			11-10-2000
			JP 2002516062 T
			04-06-2002
			WO 9932619 A1
			01-07-1999
WO 0044914	A	03-08-2000	18-08-2000
			AU 2634800 A
			24-10-2001
			EP 1147204 A1
			03-08-2000
			WO 0044914 A1
WO 9401550	A	20-01-1994	22-08-2002
			US 2002114784 A1
			AT 171210 T
			15-10-1998
			AU 4770093 A
			31-01-1994
			CA 2139319 A1
			20-01-1994
			CZ 9403332 A3
			12-07-1995
			DE 69321122 D1
			22-10-1998
			EP 0649467 A1
			26-04-1995
			FI 946201 A
			30-12-1994
			HU 69981 A2
			28-09-1995
			JP 8501928 T
			05-03-1996
			NO 945020 A
			28-02-1995
			NZ 255028 A
			24-03-1997
			PL 307025 A1
			02-05-1995
			WO 9401550 A1
			20-01-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Abkürzungszeichen

PCT/EP 02/00152

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/11 A61K31/713 C12N15/88 A61P35/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfzettel (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfzettel gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, SEQUENCE SEARCH

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitrag, Anspruch Nr.
X	WO 00 44895 A (KREUTZER ROLAND ;LIMMER STEPHAN (DE)) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument	1-240
Y	WO 98 05770 A (ROTHBARTH KARSTEN ;JOSWIG GABY (DE); WERNER DIETER (DE); SCHUBERT) 12. Februar 1998 (1998-02-12) das ganze Dokument	1-240
Y	WO 99 32619 A (CARNEGIE INST OF WASHINGTON ;MONTGOMERY MARY K (US); FIRE ANDREW () 1. Juli 1999 (1999-07-01) das ganze Dokument	1-240
Y	WO 00 44914 A (FARRELL MICHAEL J ;LI YIN XIONG (US); KIRBY MARGARET L (US); MEDIC) 3. August 2000 (2000-08-03) das ganze Dokument	1-240

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt worden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindungstheoretischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindungstheoretischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

7. Januar 2003

Abenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/01/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäische Patentamt, P.B. 5818 Patenthaus 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Armandola, E

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	ZAMORE PHILLIP D ET AL: "RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 1, 31. März 2000 (2000-03-31), Seiten 25-33, XP002208683 ISSN: 0092-8674 das ganze Dokument	1-240
Y	BASS BRENDA L: "Double-stranded RNA as a template for gene silencing" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, Bd. 101, Nr. 3, 28. April 2000 (2000-04-28), Seiten 235-238, XP002194756 ISSN: 0092-8674 Abbildung 1	1-240
Y	UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" CHEMICAL REVIEWS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, US, Bd. 90, Nr. 4, 1. Juni 1990 (1990-06-01), Seiten 543-584, XP000141412 ISSN: 0009-2665 das ganze Dokument	20-30, 60-70, 99-109, 140-150, 180-190, 219-229
Y	PARRISH S., FLEENOR J., ET AL.: "Functional Anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference." MOL. CELL, Bd. 6, November 2000 (2000-11), Seiten 1077-187, XP002226361 das ganze Dokument	1-240
Y, P	AMBROS VICTOR: "Dicing up RNAs" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, Bd. 293, Nr. 5531, 3. August 2001 (2001-08-03), Seiten 811-813, XP002183122 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument	1-240

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/00152

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y,P	ELBASHIR SAYDA M ET AL: "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs" GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 15, Nr. 2, 15. Januar 2001 (2001-01-15), Seiten 188-200, XP002204651 ISSN: 0890-9369 das ganze Dokument -----	1-240
A	WO 94 01550 A (AGRAWAL SUDHIR ;HYBRIDON INC (US); TANG JIN YAN (US)) 20. Januar 1994 (1994-01-20) -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Altkennzeichen

PCT/EP 02/00152

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0044895	A	03-08-2000	DE 19956568 A1	17-08-2000
			AT 222953 T	15-09-2002
			AU 3271300 A	18-08-2000
			WO 0044895 A1	03-08-2000
			DE 10080167 D2	28-02-2002
			DE 50000414 D1	02-10-2002
			EP 1144623 A1	17-10-2001
			EP 1214945 A2	19-06-2002
WO 9805770	A	12-02-1998	DE 19631919 A1	12-02-1998
			WO 9805770 A2	12-02-1998
			EP 0918853 A2	02-06-1999
WO 9932619	A	01-07-1999	AU 743798 B2	07-02-2002
			AU 1938099 A	12-07-1999
			CA 2311999 A1	01-07-1999
			EP 1042462 A1	11-10-2000
			JP 2002516062 T	04-06-2002
			WO 9932619 A1	01-07-1999
WO 0044914	A	03-08-2000	AU 2634800 A	18-08-2000
			EP 1147204 A1	24-10-2001
			WO 0044914 A1	03-08-2000
			US 2002114784 A1	22-08-2002
WO 9401550	A	20-01-1994	AT 171210 T	15-10-1998
			AU 4770093 A	31-01-1994
			CA 2139319 A1	20-01-1994
			CZ 9403332 A3	12-07-1995
			DE 69321122 D1	22-10-1998
			EP 0649467 A1	26-04-1995
			FI 946201 A	30-12-1994
			HU 69981 A2	28-09-1995
			JP 8501928 T	05-03-1996
			NO 945020 A	28-02-1995
			NZ 255028 A	24-03-1997
			PL 307025 A1	02-05-1995
			WO 9401550 A1	20-01-1994

98. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 97, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

5 99. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 98, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

10 100. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 99, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht ist.

15 101. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 100, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet
20 ist.

102. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 101, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

25

103. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 102, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder
30 Oligoethylenglycol-Ketten sind.

104. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 103, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

105. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 104, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet ist.
- 5 106. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 105, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet ist.
107. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 106, wobei
10 zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 15 108. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 107, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
- 20 109. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 108, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.
- 25 110. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 109, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen ist.
111. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 110, wobei
30 die dsRNA I an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist/sind.

112. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 111, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

113. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 112, wobei
5 das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

114. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 113, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem
10 Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

115. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 114, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I zum primären oder pro-
15 zessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

116. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 115, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

20 117. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 116, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstandet sind.

25 118. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 117, wobei die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg pro Verabreichungseinheit enthalten ist.

119. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 118, wobei
30 die dsRNA in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

120. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 119, wobei die dsRNA oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreichbar ist.

121. Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle umfassend die folgenden Schritte:

5

Einführen mindestens einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

10 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

15

und wobei die dsRNA zumindest an einem Ende (E1, E2) der dsRNA I einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

20 122. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

123. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die dsRNA I an
25 einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

124. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

30 125. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

126. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
zumindest eine entsprechend der dsRNA I nach einem der vorher-
gehenden Ansprüche ausgebildete weitere doppelsträngige
Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird,
5 wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten
Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei ein weiterer Strang
(as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2)
der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des
10 Zielgens ist.

127. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als
25, vorzugsweis 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleo-
15 tidpaaren aufweist/en.

128. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise
überlappen oder aneinander grenzen.
20

129. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-
standet sind.

25 130. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

131. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,
30 Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese
induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von
Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an meta-
stasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Ge-

ne von Proteinasen sowie Apoptose- und Zellzyklus-regulierenden Molekülen.

132. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
5 das Zielgen das MDR1-Gen ist.

133. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus
zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnse-
10 quenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen
SQ141 - 173 verwendet wird.

134. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt
15 wird.

135. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmo-
dien, exprimiert wird.

20

136. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

137. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus ein humanpa-
25 thogenes Virus oder Viroid ist.

138. Verfahren nach Anspruch 16, wobei das Virus oder Viroid
ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

30 139. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substitu-
iert sind.

140. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA I/II modifiziert wird, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

5

141. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht wird.

10

142. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

15

143. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

20

144. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

25

145. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

30

146. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

147. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

5 148. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
10

149. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.
15

150. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
20

151. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.

25 152. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.

30 153. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

154. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 5 155. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 10 156. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
157. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
15 die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
158. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm
20 Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.
159. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen
25 men ist.
160. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.
30
161. Verwendung einer die doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA I) zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle,

wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist, und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

10

162. Verwendung nach Anspruch 41, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

15 163. Verwendung nach Anspruch 41 oder 42, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

164. Verwendung nach Anspruch 43, wobei das glatte Ende (E1, E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

20

165. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 44, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

25 166. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 45, wobei zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 41 bis 45 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II) in die Zelle eingeführt wird, wobei der eine Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des einen
30 Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Sinn-Strangs des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

167. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

168. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 47, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

169. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 48, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beabstandet sind.

170. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 49, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

171. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 50, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierenden Molekülen.

172. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 51, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

173. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 52, wobei als dsRNA I/II eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (asl/2) und Sinnsequenzen (ssl/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 - 173 verwendet wird.

174. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 53, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.
- 5 175. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 54, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
176. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 55, wobei das
10 Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
177. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 15 178. Verwendung nach Anspruch 56, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
179. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 58, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert
20 sind.
180. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 59, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert wird, um einen Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
25
181. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 60, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische
30 Verknüpfung erhöht wird.
182. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 61, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwir-

kungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.

183. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 62, wobei die
5 chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

184. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 63, wobei die
chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder Oligoethylenglycol-Ketten sind.

185. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 64, wobei die
15 chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet wird.

186. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 65, wobei die
chemische Verknüpfung durch Purinanaloga gebildet wird.

20 187. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 66, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet wird.

188. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 67, wobei zur
25 Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.

30 189. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 68, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.

190. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
- 5 191. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 70, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
192. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 71, wobei die
10 dsRNA I/II an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird/werden.
193. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 72, wobei das
15 Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
194. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 73, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-
20 Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
195. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 74, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
25
196. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 75, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I/II zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
30
197. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 76, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

198. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 77, wobei die dsRNA I/II in einer Menge von höchstens 5 mg je Kilogramm Körpergewicht pro Tag einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.

5

199. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 78, wobei die dsRNA I/II zur Applikation in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

10 200. Verwendung nach einem der Ansprüche 41 bis 79, wobei die dsRNA I/II oral oder mittels Injektion oder Infusion intravenös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreicht wird.

15 201. Medikament zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA I) in einer zur Hemmung der Expression des Zielgens ausreichenden Menge,

20 wobei die dsRNA I eine doppelsträngige aus höchstens 49 aufeinander folgenden Nukleotidpaaren gebildete Struktur aufweist,

und wobei ein Strang (as1) oder zumindest ein Abschnitt des
25 einen Strangs (as1) der doppelsträngigen Struktur komplementär zum Zielgen ist,

und wobei die dsRNA I zumindest am einen Ende (E1, E2) einen aus 1 bis 4 Nukleotiden gebildeten Überhang aufweist.

30

202. Medikament nach Anspruch 81, wobei die dsRNA I den Überhang am 3'-Ende des einen Strangs (as1) und/oder am 3'-Ende des anderen Strangs (ss1) aufweist.

203. Medikament nach Anspruch 81 oder 82, wobei die dsRNA I an einem Ende (E1, E2) glatt ausgebildet ist.

204. Medikament nach Anspruch 83, wobei das glatte Ende (E1,
5 E2) das 5'-Ende des einen Strangs (as1) enthält.

205. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 84, wobei der Überhang aus 1 bis 4 Nukleotiden, vorzugsweise 1 oder 2 Nukleotiden, gebildet ist.

10

206. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 85, enthaltend zumindest eine weitere entsprechend der dsRNA I nach einem der Ansprüche 81 bis 85 ausgebildete doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA II), wobei der eine Strang (as1) oder
15 zumindest ein Abschnitt des einen Strangs (as1) der dsRNA I komplementär zu einem ersten Bereich (B1) des Zielgens ist, und wobei der weitere Strang (as2) oder zumindest ein Abschnitt des weiteren Strangs (as2) der dsRNA II komplementär zu einem zweiten Bereich (B2) des Zielgens ist.

20

207. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 86, wobei die dsRNA I und/oder die dsRNA II eine Länge von weniger als 25, vorzugsweise 19 bis 23, aufeinander folgenden Nukleotidpaaren aufweist/en.

25

208. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 87, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) abschnittsweise überlappen oder aneinander grenzen.

30 209. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 88, wobei das Zielgen eine der Sequenzen SQ001 bis SQ140 aufweist.

210. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,

Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Prionen, Gene von Angiogenese induzierenden Molekülen, von Adhäsions-Molekülen und von Zelloberflächenrezeptoren, Gene von Proteinen, die an metastasierenden und/oder invasiven Prozessen beteiligt sind, Gene von Proteinasen sowie von Apoptose- und Zellzyklusregulierende Molekülen.

211. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 90, wobei das Zielgen das MRD1-Gen ist.

10

212. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 91, wobei als dsRNA eine der Sequenzen SQ141 -173 bzw. ein aus zwei jeweils zusammengehörenden Antisinn- (as1/2) und Sinnsequenzen (ss1/2) kombiniertes dsRNA-Konstrukt der Sequenzen SQ141 -

15 173 verwendet wird.

213. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 92, wobei die Expression nach dem Prinzip der RNA-Interferenz gehemmt wird.

20 214. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 93, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

215. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 94, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

216. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

30 217. Medikament nach Anspruch 95, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

218. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 97, wobei ungepaarte Nukleotide durch Nukleosidthiophosphate substituiert sind.

5 219. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 98, wobei zumindest ein Ende (E1, E2) der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.

10 220. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 99, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine chemische Verknüpfung erhöht ist.

15 221. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 100, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet
20 ist.

222. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 101, wobei die chemische Verknüpfung in der Nähe des einen Endes (E1, E2) gebildet ist.

25

223. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 102, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol)- und/oder
30 Oligoethylenglycol-Ketten sind.

224. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 103, wobei die chemische Verknüpfung durch anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloga gebildet ist.

225. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 104, wobei die chemische Verknüpfung durch Purinanaloge gebildet ist.
- 5 226. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 105, wobei die chemische Verknüpfung durch Azabenzoleinheiten gebildet ist.
227. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 106, wobei
10 zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 15 228. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 107, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
- 20 229. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 108, wobei die chemische Verknüpfung durch in der Nähe der Enden (E1, E2) befindliche Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.
- 25 230. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 109, wobei die dsRNA I/II in micellare Strukturen, vorteilhafterweise in Liposomen, eingeschlossen ist.
- 30 231. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 110, wobei die dsRNA I an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist/sind.

232. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 111, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.

5 233. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 112, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

234. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 113, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem
10 Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.

235. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 114, wobei der eine Strang (as1, as2) der dsRNA I zum primären oder pro-
15 zessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

236. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 115, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

20

237. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 116, wobei der erste (B1) und der zweite Bereich (B2) voneinander beab-
standen sind.

25 238. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 117, wobei die dsRNA in einer Menge von höchstens 5 mg pro Verabreichungseinheit enthalten ist.

239. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 118, wobei
30 die dsRNA in eine Pufferlösung aufgenommen ist.

240. Medikament nach einem der Ansprüche 81 bis 119, wobei die dsRNA oral oder mittels Injektion oder Infusion intrave-

nös, intratumoral, inhalativ, intraperitoneal verabreichbar
ist.

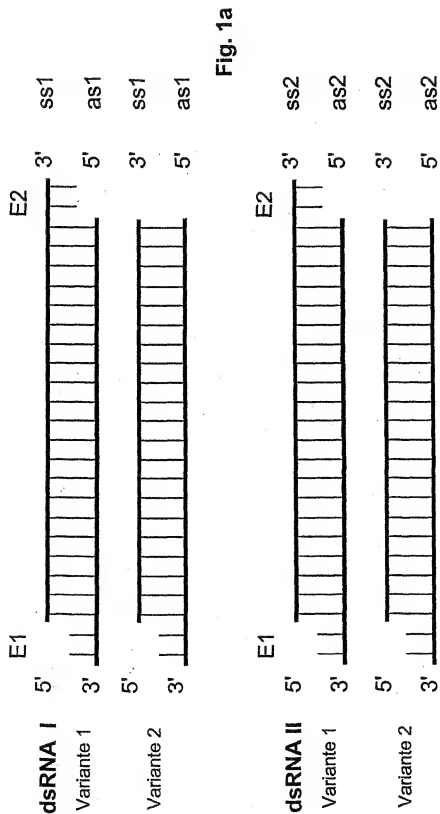
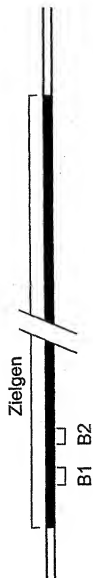


Fig. 1b



2/20

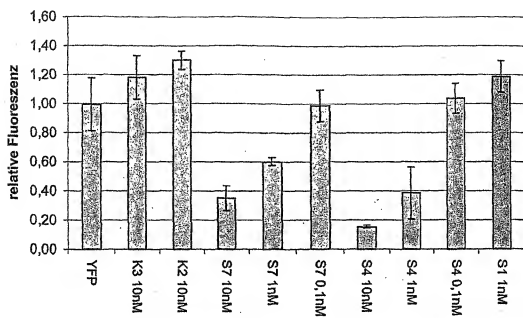


Fig. 3

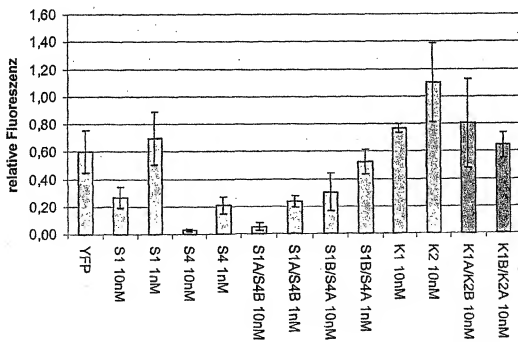
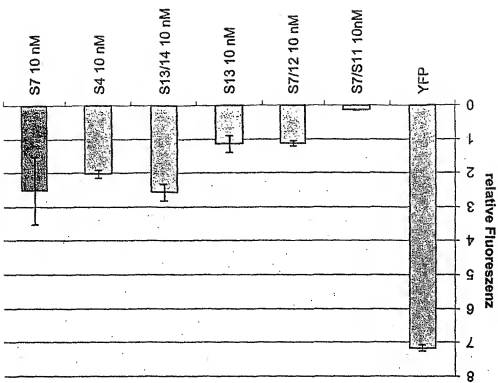
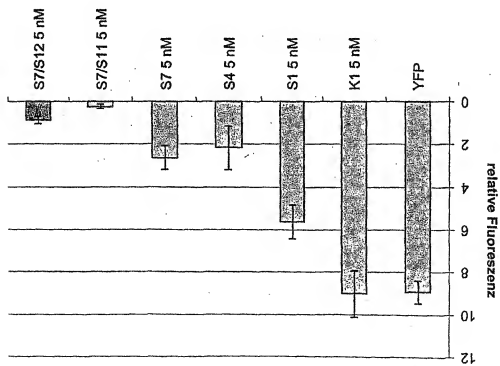


Fig. 4



4/20

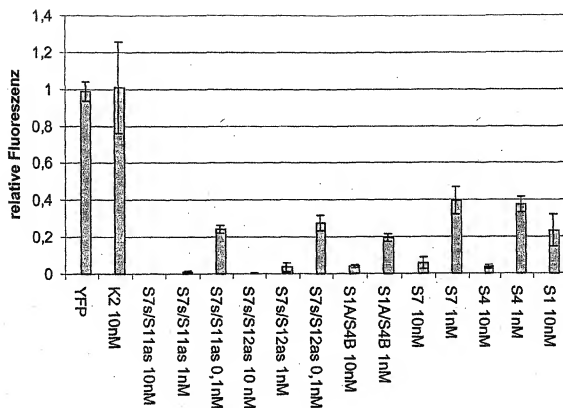


Fig. 7

5/20

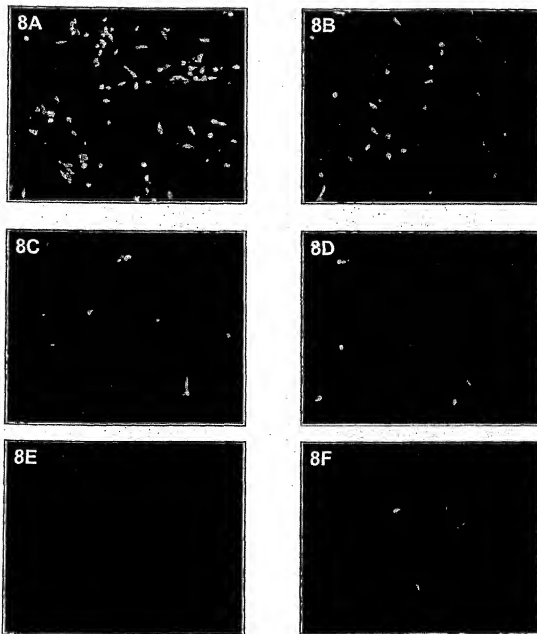


Fig. 8

6/20

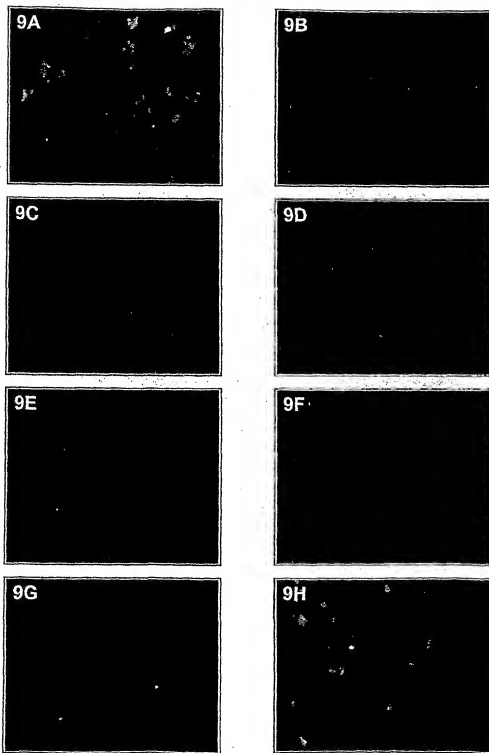


Fig. 9

7/20

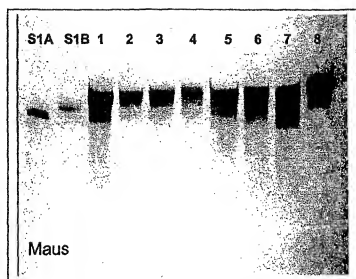


Fig. 10

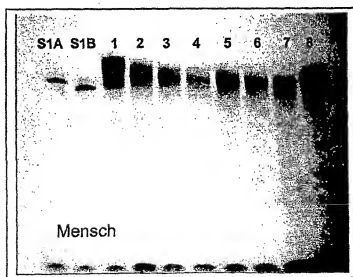


Fig. 11

8/20

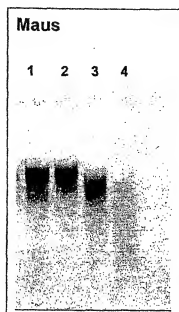


Fig. 12

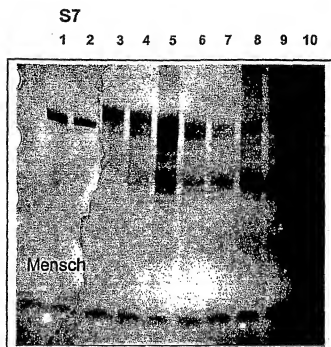


Fig. 13

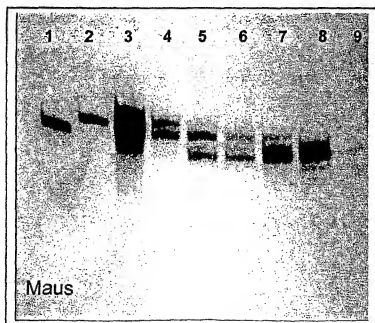


Fig. 14

9/20

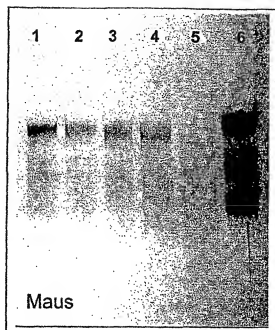


Fig. 15

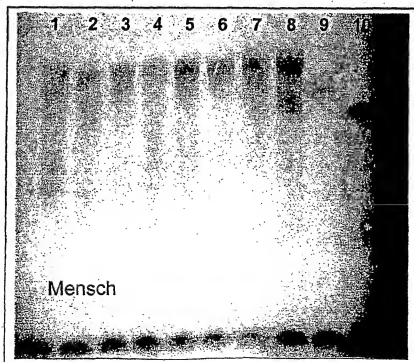


Fig. 16

10/20

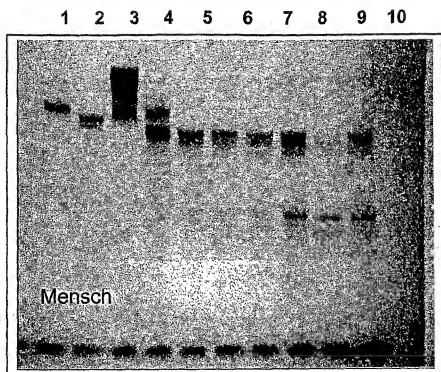


Fig. 17

11/20

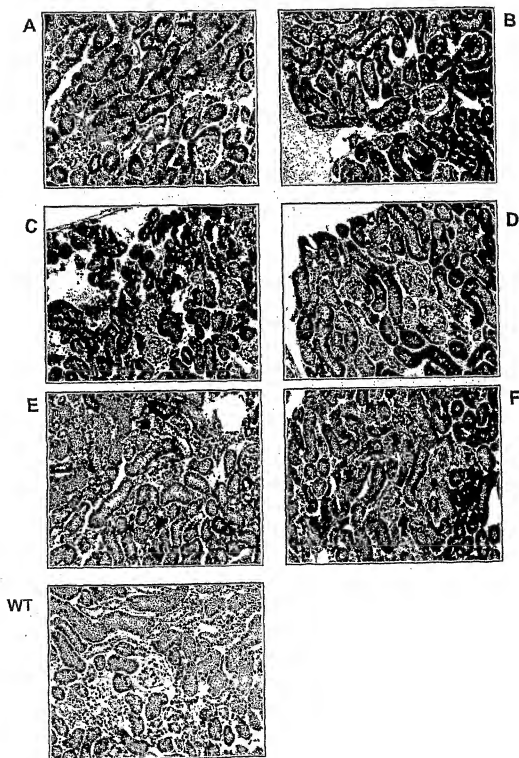


Fig. 18

12/20

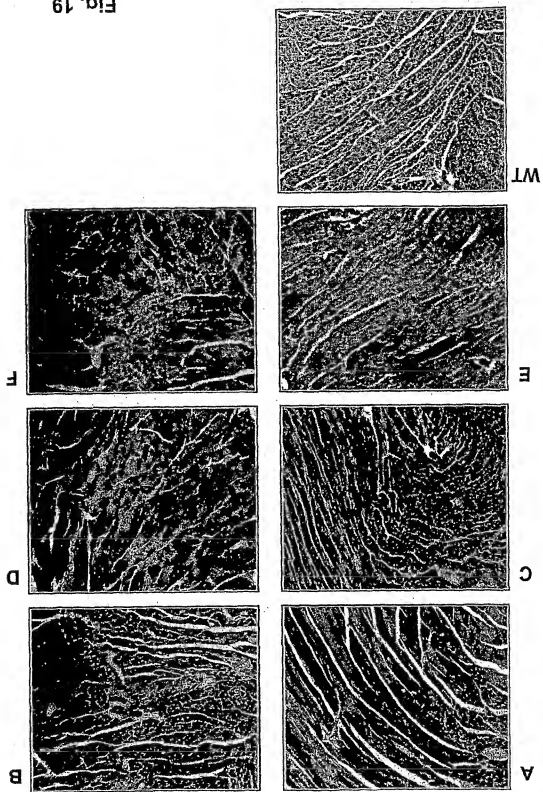


Fig. 19

13/20

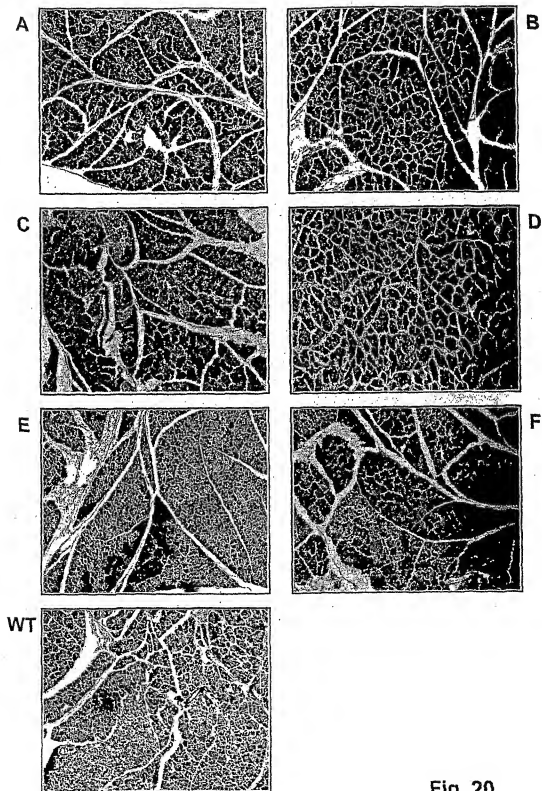
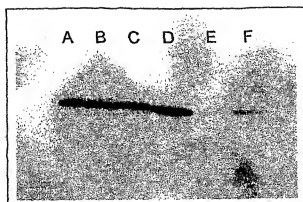
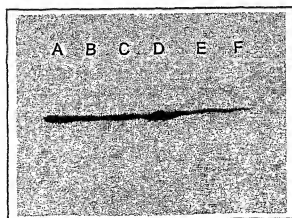


Fig. 20

14/20

**Fig. 21****Fig. 22**

15/20

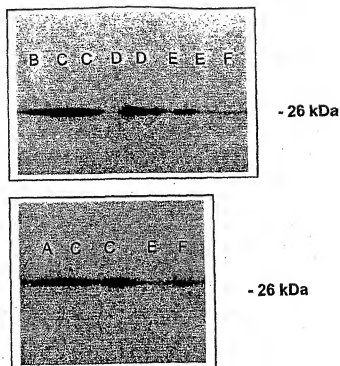


Fig. 23

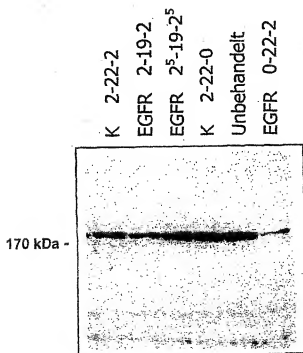


Fig. 24

16/20

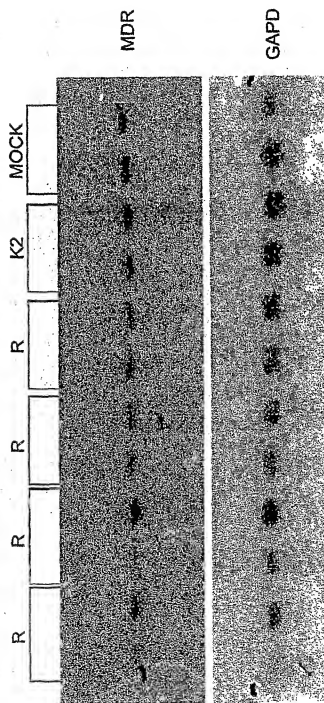


Fig. 25a

17/20

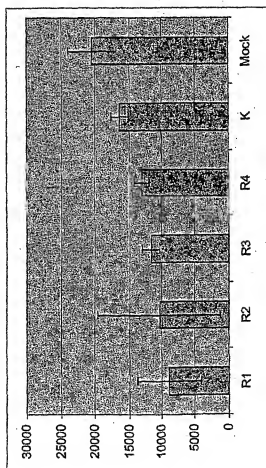


Fig. 25b

18/20

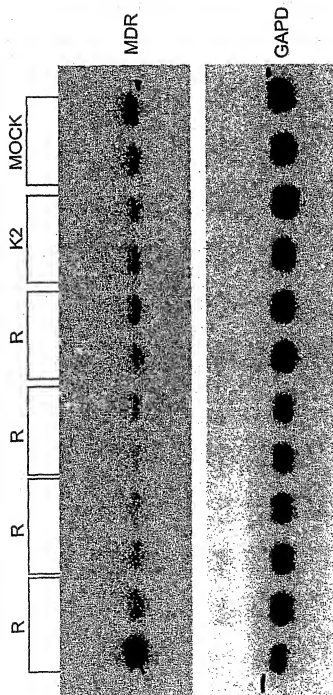


Fig. 26a

19/20

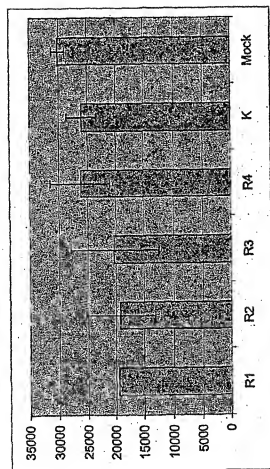
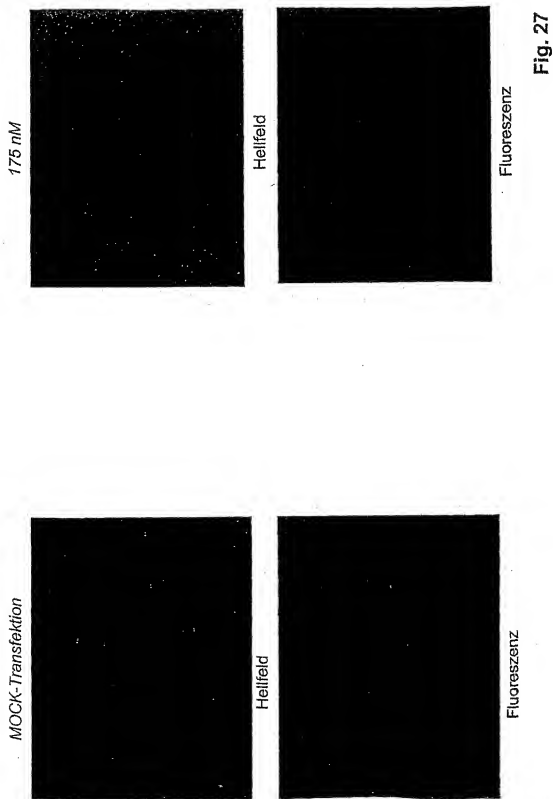


Fig. 26b

20/20



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Ribopharma AG

5 <120> Verfahren zur Hemmung der Expression
eines Zielgens

<130>

10 <140>

<141>

<160> 142

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2955

<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<300>

<302> Bph A1

<310> NM00532

25 <300>

<302> ephrin A1

<310> NM00532

30 <400> 1

```

atggagcggc gctggccct ggggctaggc ctgggtgtgc tgcctctgcg cccgctgccc 60
ccggggggcg gcgccaaagg agttactctg atggacacaa gcaaggcaca gggagagctg 120
ggctggcctgc tggatccccc aaaagatggg tggagtgaac agcaacagat actgaatggg 180
acacccctctt acatgtacca ggactgcccc atgcaaggac gcagagacac tgaccactgg 240
ctctgcctcca attggatcta ccgcggggag gaggcttccc gcgtccacgt ggagctgcag 300
ttcaccctgc gggactgcaa gagtttccct gggggagccg ggcctctggg ctgcaggagg 360
accttcaacc ttctgtacat ggagagtgc caggatgtgg gcattcagct ccgacggccc 420
ttgttcacga aggttaaccac ggtggctgca gaccagagct tcaccattcg agaccttgcc 480
ctgggtcccg tgaagctgaa tgtggagcgc tgcctctcgg gcgcctgcac ccgcctgggc 540
ctctacctcgc ctttccacaa cccgggtgcc tgtgtggccc tgggtgtctgt ccgggtcttc 600
taccagcgct gtccctgagac cctgaatggc ttggcccaat tccagacac tctgctctggc 660
cccgctgggt tgggtggaagt ggccgggcaac tgcttgcccc acgcgcgggc cagcccccagg 720
ccctcagggt caccocgcac gcactgcagc cctgatggcg agtggctggt gcctgtaggg 780
cggtgccact gtgagcctgg ctataggaa ggtggcagtg gcgaagcatg tgttgctcgc 840
cctagcggct cctaccggat ggacatggac acacccatt gtctcactgc ccccagcag 900
agcactgctg agtctgaggg ggccaccatc tgtacctgtg agagcggcca ttacagagct 960
cccggggagg gcccccagggt ggcacacaca ggtccccct cggcccccg aaacctgagc 1020
ttctctgect caggagctca gctctccctg cgttggaac cccagcaga tacgggggga 1080
cgccaggatg tcagatacag tctgaggtgt tcccagtg agggcacagc acagagccgg 1140
ggccctctcc agccctctgg ggtggcgctg cacttctgc cggggggccc ggccctcacc 1200
acacctgaat tgcattgcaa tggccttgaa ccttatgcca actacacctt taatgtgaa 1260
gcccaaaagc gagtgtcagg gctggcagc ctggcccatc cagcacctc agtcagcatc 1320
agcatggggc atgcagagtc actgtcagc ctgtctctga gactggtgaa gaaagacccg 1380
atgcaactag agctgacctg ggccgggtcc cggccccgaa gccctggggc gaacctgacc 1440
55 ttgagctgc acgtgtcgaa ccaggatgaa gaacggtacc agatggttct agaaccocagg 1500
gtcttgcctg cagagctgca gcctgacacc acatatatcg tcagagtcgg aatgctgacc 1560
ccactgggtc ctggcccttt ctcccctgat gcctgagttc ggaccagccc accagtgctc 1620
aggggcctga ctggaggaga gattgtagcc gtcatctttg ggctgctgct tggctgagcc 1680
ttgctgcttg ggaattctcgt ttcccggtcc aggagagccc agoggcagag gcagcagagg 1740
60 cactgcagcc cgccaccgat ttggatcgag aggcacagct gtgctgaagc cttatgtgtg 1800
acctccagcg atacagaggc cctgcacagg gaggcttggg ctttaccocg aggcctggct 1860
aattttctct cccgggagct tgatccagcg tggctgatgg tggacactgt cataggagaa 1920

```


	tctactacog	agatccatcc	atcctgtgtc	actcggcaga	agggtgatcgg	agcaggagag	1980
	tttggggagg	tgtaacaagg	catgctgaag	acatcctcgg	ggaagaaggga	ggtgcggctg	2040
	gccatcaaga	cgctgaaggc	cggtctacaca	gagaagcagc	gagtggaactt	cctcgccgag	2100
	gccgcgcatca	tgggccgactt	cagccaccac	aacatcatcc	gcgtagagggg	cgtcatctcc	2160
5	aaatacaagc	ccatgatgat	catcactcag	tacatggaga	atggggccctc	ggacaagtcc	2220
	cttcgggaga	aggatggcga	gttcagcgtg	ctgcagctgg	ctcatctgct	gcggggcctc	2280
	cgagctggca	tgaagtacct	ggccaacatg	aactatgtgc	acogtgcact	ggctgcgccg	2340
	aacatcctcg	tcaacagcaa	cctggctctg	aaggtgtctg	actttggcct	gtcccgctg	2400
	ctggaggagc	accccagggc	cacotacacc	accagtgccg	gcaagatccc	catccogctg	2460
10	accgccccgg	aggccatttc	ctacccgaag	ttcaccctcg	cccctgactc	ctccagactt	2520
	ggcatctgtca	tgtgggaggt	gatgacctat	ggcgagcggc	cctactggga	gtgtgccaa	2580
	cacgaggtga	tgaaggccat	caatgatggc	ttccggctcc	ccacacccat	ggactgcccc	2640
	tccgccatct	accagctcat	gatgcagtgc	tggcagcagg	agcgtgcccc	ccgcgccca	2700
	ttcgctgaca	tcgtcagcat	cctggacaag	ctcattcgtg	cccctgactc	cctcaagacc	2760
15	ctggctgact	ttgacccccc	cgtgtctatc	cggtccccc	gcacgagcgg	ctcggagggg	2820
	gtgcctctcc	gcacgggtgtc	cgagtggctg	gagtgccatca	agatgcagca	gtatcacggg	2880
	cacttcctac	ggcccgcgcta	cactgccatc	gagaaaggtg	tgacagatgac	caacgcagac	2940
	atcaagagga	ttgggggtcgg	gctgcgccgg	caccagaagc	gcatacgcta	cagcctgctg	3000
	ggactcaagg	accaggtgaa	cactgtgggg	atccccaact	ga		3042
20							
	<210>	3					
	<211>	2953					
	<212>	DNA					
25	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	ephrin A3					
	<310>	NM005233					
30							
	<400>	3					
	atggattgtc	agctctccat	cctcctcctt	ctcagctget	ctgtttctcga	cagcttcggg	60
	gaactgattc	cgcagccttc	caatgaagtc	aatctactgg	attcaaaaac	aattcaaggg	120
35	gagctgggct	ggatctctta	tcacatcacat	gggtgggaag	agatcagttg	tgtgggatgaa	180
	cattacacac	ccatcaggagc	ttaccagggtg	tgcaatgtca	tggaccacag	tcaaaaacaat	240
	tggctgagaa	caaaactgggt	ccccagggaac	tcagctcaga	agatttatgt	ggagctcaag	300
	ttcactctac	gagactgcga	tagcattcca	ttgggttttag	gaacttgcaa	ggagacattc	360
	aaactgtact	acatcggaat	tgatgatgat	catgggggtga	aaattcgaga	gcacagtttt	420
40	acaaagattg	acaccat tgc	agctgatgaa	agt ttcaact	aaatggatct	tggggaccgt	480
	attctgaaag	gattagagaa	gat tagagaa	atgttcagct	tcaacaagaa	gggattttat	540
	ttggcatctt	aaagtgttgg	tgcttgtgtt	gccttggtgt	ctgtgagagt	atacttcaaa	600
	aaagtcccat	ttacagtgaa	gaatctggct	atgtttccag	acacggtacc	catggactcc	660
	cagtcctcgg	tggaggttag	agggtcttgt	gtcaacaatt	ctaaggagga	agatcctcca	720
	aggatgtact	gcagtacaga	aggogaatgg	ctgtgaccga	ttggcaagta	cttctgcaat	780
45	gtcgctcatg	aagaaagagg	ttttatgtgc	caagctgtgc	gaccaggttt	tcaacaaggca	840
	tggatggata	atatgaagtg	tgctaagtg	cgcctcaca	gttctactca	ggaagatggt	900
	tcaatgaact	cgaggtgtga	gaataaattc	ttccgggcag	acaaaagccc	tccatccatg	960
	gcttgttacc	gacctccatc	ttcaccaga	aatgttatct	ctaatataaa	cgagaactca	1020
	gttatcctgg	actggagttg	gccctggagc	acaggaggcc	ggaaagatgt	taccttcaac	1080
50	atcatatgta	aaaaatttgg	gtggaaatata	aaacaggtg	agccatgcag	cccaactctg	1140
	cgctctctcc	ctcgacagtt	tggactcacc	aacacccagg	tgacagtgc	agacattctg	1200
	gcacatacta	actacacctt	tgagattgat	gcctgtaagt	gggtgtcaga	gctgagcttc	1260
	gcaccaagac	agttttctgc	ggtcagcatc	acaaactaac	aggctgtctc	atcacctctc	1320
	ctgcagcata	agaaaagatg	gacctccaga	aatagcatct	ctttgtcctg	gcaagaacct	1380
55	tgagatccca	attggactcat	attggactcat	gaggtcaaat	actatgaaa	gcaggagacaa	1440
	gaacaagatt	atacattctc	gagggcaaga	ggcacaatat	ttaccatcag	tagcctcaag	1500
	ctgcacacta	tatacgtatt	ccaaatccga	gcccggtaga	cccgctgata	tggagacagc	1560
	agccgcgaagt	ttgagtttga	aactagtcca	gactctttct	ccatctcttg	tgaagttagc	1620
	caagtgtgca	tgatgcccat	ttcagcggca	gtagcaatta	ttctctccac	tgtgtgctac	1680
60	tttgttttga	ttggggaggt	ctgtggctat	aagtcacaa	atggggcgca	tgaaaaagga	1740
	cttcatittg	gcaatgggca	tttaaaactt	ccaggtctca	ggacttatgt	tgaccacat	1800
	acatatgaag	accctaccca	agctgttcat	gagtttgcca	aggaattgga	tgcacccaac	1860

	atattccattg	ataaagtgtgt	tggagcaggt	gaatttggag	aggtgtgcag	tgggtcgotta	1920
	aaacttcctt	caaaaaaaga	gatttcagtg	gcattataaaa	cctgaaaggt	tgggtacaca	1980
	gaaaagcaga	ggagagactt	cotggggaga	gcaagcatta	tgggacaggt	tgaccacccc	2040
	aatcatcttc	gactgggaag	agttgtttacc	aaaagtaagc	cagtttatgt	tgctacagaa	2100
5	tacatcgga	atgggttcctt	ggatagtttc	ctacgtataac	acgatgcaca	gtttactgtc	2160
	atcagactgt	tggggatgct	tccgagggata	gcattctggca	gaaagtaacct	gtcagacatg	2220
	gggtatgttc	acccagacact	cgctgctcgg	aacatcttga	tcaacagtaa	cttgggtgtg	2280
	aaggtttctg	atctcgactt	tctcgcgtgc	ctggaggatg	accagcaagc	tgtctataca	2340
	acaagaggag	ggaagatccc	aatcaggtgg	acatcacacc	aagctatagc	ctaccgcaag	2400
10	ttcacgtctg	ccagcgatgt	atggagttat	gggattgttc	tctggggaggt	gtcagcttat	2460
	ggagagagac	catactggga	gatgtccaat	caggatgtaa	ttaaagctgt	agatgagggc	2520
	tatcgactcg	caccccccat	ggactgcaca	gtgcctctgt	atcagctgat	ctggagctgc	2580
	tggcagaaga	acaggaaacaa	cagaccacaag	tttgagcaga	ttgttagtat	tctggacaag	2640
	cttatccgga	atccccgcag	cctgaagatc	atcacccagt	cagccgcaag	gccatcaaac	2700
15	cttctctctg	accaaagcaa	tgtggatatt	tctaccttcc	gcacaacagg	tgactgggctt	2760
	aatgggtgtc	ggacagcaca	ctgcaaggaa	atcttcacgg	cggtggagta	gactctctgt	2820
	gacacaaatg	ccaagatttc	cacagatgac	atgaaaaagg	ttgggtgtcac	cggtgggtgg	2880
	ccacagaaga	agatcatcag	tagcattaaa	gctctagaaa	cgcaatcaaa	gaatggccca	2940
20	gtccccgtg	aaa					2953
	<210>	4					
	<211>	2784					
	<212>	DNA					
25	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
	<302>	ephrin A4					
	<310>	XM002578					
30	<400>	4					
	atggatgaaa	aaaatacacc	aatccgaacc	taccaagtgt	gcaatgtgat	ggaacccagc	60
	gcgaataaact	ggctacgaa	tgattggatc	accgagaag	gggtccagag	gggtgtatatt	120
	gagattaaat	tcaccttgag	ggactgcaat	agtccttcgg	gggtccatggg	gaacttgcag	180
35	gagacgttta	acctgtacta	ctatgaatac	gacaacgaca	aagagcgttt	catcagagag	240
	aacacagttt	tcaaaaatga	caccattgct	gctgatgaga	gcttcaccca	agtgggacatt	300
	gggtgacgaa	tcatgaagct	gaacacccag	atccgggatg	tagggccatt	aagcaaaaaa	360
	gggttttacc	tggcttttca	ggatgtgggg	gctgcacatg	ccctgggtatc	agtcogtgtg	420
	ttctataaaa	agtgctccat	cacagtccgc	aatctggccc	agtttctctga	caccatcaca	480
40	ggggctgata	cgctctccct	gggtgggaagt	cgaggtctct	gtgtcaacaa	ctcagaagag	540
	aaagattgtc	caaaaatgta	ctgtggggca	gatggtgaat	ggctgggtacc	cattggccaac	600
	tgcctatgca	acgctgggta	tgaggagcgg	agcggagaat	gccaagcttg	caaaaattgga	660
	tattacaagg	ctctctccac	ggatgccacc	tgtgccaaat	gcccaccoca	cagctaactct	720
	gtctgggaag	gagccacatc	gtgcactgtg	gaccaggtct	ttttcagagc	tgacaacgat	780
45	ctgtgcctcta	tgcctcgac	cogtccacca	tctgctcccc	tgaacttgat	ttcaaatgtc	840
	aacgagacat	ctgtgaactt	ggaatggagt	agccctcaga	atacaggtgg	ccgccaaggac	900
	atttctcata	atgtggttat	caagaaatgt	ggagctgggt	accccagcaa	gtgcgcagacc	960
	tgtggaagtgt	gggtccacta	caacccacag	cagaatggct	tgaagaccac	caaaagtctcc	1020
	atcaactgac	tcttagtgtc	taccaaatac	acctttgaaa	tctgggctgt	gaatggagtg	1080
50	tccaaataata	accctcaacc	agaccaatca	gtttctgtca	ctgtgaccac	caacccaagca	1140
	gcaccatcat	ccattgcttt	ggtccaggct	aaagaagtca	caagatcacg	tgtggccagt	1200
	ctgtggctgg	aaccagatcg	gcccaatggg	gtaatctcgg	aatatgaagt	caagattatt	1260
	gagaaggatc	agaaatggag	aagctatcgt	atagttcgga	cagctgcacg	gacaacacgat	1320
	atcaaaagcc	tgaacccctc	caacttctat	gttttccacg	tccagagccg	gacagcagct	1380
55	ggctatggag	acttcagtg	gcctctggag	gcatacaaca	acacaggtgc	ttccoggatc	1440
	atggagatgt	gggtcactct	cacagtctct	ctggctctgt	tctcgggcag	tgtgggtgtc	1500
	gtggtaattc	tcatgtcagc	ttttgtcatc	agccggagac	ggagtaataa	tgacgcatcc	1560
	aaacaaagag	ccgatgaaga	gaacacattg	aatcaagggt	tgaagaacata	tgtgggccccc	1620
	tttactgtac	aagatcccca	ccaagcagtg	cgagagtttg	ccaaagacaa	tgacgcatcc	1680
60	tgcatttaaga	ttgaaaaaagt	tataggagtt	ggtgaatttg	gtgaggtatg	cagtgggcgt	1740
	ctcaaaagtc	ctggccaagag	agagatctgt	gtggctatca	agactctgaa	agctggttat	1800
	acagacaac	agaggagaga	cttctctgag	gaggccagca	tcatgggaca	gtttgacctt	1860

	cogaacatca	ttcaacttga	aggcgttggtc	actaaatgta	aaccagtaat	gatoataaca	1920
	gagtaacatg	agaatggctc	cttggatgca	ttcctcagga	aaaatgatgg	cagattttaca	1980
	gtatttcacg	tggtgggcat	gcttcgtggc	atgggtctctg	ggatgaagta	ttatctgcat	2040
	atgagctatg	tgcatcgtga	tctggccgca	cggaaacatcc	tggtgaacag	caactctggtc	2100
5	tgcaaaagtgt	ctgatttttg	catgtcccga	gtgcttgagg	atgatccgga	agcagcttac	2160
	accaccaggg	gtggccaagt	tccatccggg	tggaactggc	cagaagcaat	tgccatcgt	2220
	aaattccaat	cagcaagtga	tgtatggagc	tatggaatcg	ttatgtggga	agtgtatgtc	2280
	tacggggaga	ggccctattg	ggatatgtcc	aatcaagatg	tgatttaagc	catctaggaa	2340
	ggctatcggg	taccocctcc	aatggactgc	cccattggcg	tccaccagct	gatgttagac	2400
10	tgctggcaga	aggagaggag	cgacaggcct	aaatttgggc	agattgtcaa	catgttgga	2460
	aaactcatcc	gcaaccccaa	cagcttgaag	aggacaggga	cggagagctc	cagacccaac	2520
	actgccttgt	tggtatcca	ctccctgtaa	ttctctgctg	tggtatcagt	ggcgatctgg	2580
	ctccaggcca	ttaaaatgga	cgggtataag	gataacttca	cagctgtctg	ttataccaca	2640
	ctagaggctg	tggtgcacgt	gaaccaggag	gacctggcaa	gaattggtat	cacagccatc	2700
15	acgcaccaga	ataagatttt	gagcagtgct	caggcaatgc	gaacccaaat	gcagcagatg	2760
	cacggcagaa	tggttcccg	ctga				2784
	<210>	5					
20	<211>	2997					
	<212>	DNA					
	<213>	Homo sapiens					
	<300>						
25	<302>	ephrin A7					
	<310>	XM004485					
	<400>	5					
	atggtttttc	aaactcggta	cccttcatgg	attattttat	gtacatctg	gctgctccgc	60
30	tttgcaacac	caggggaggc	gcaggctcgc	aagggaagtac	tactctgga	ttctaaagca	120
	caacaaacag	agttggagtg	gatttctctc	ccacccaagt	ggtgggaaga	aattagttgt	180
	ttggatgaga	actatacccc	gatacgaaca	taccaggtgt	gcacagatcat	ggagcccaac	240
	caaaacaact	ggctcggcga	taactggatt	tcacaaggca	atgcacaaga	gattttttgt	300
	gaattgaaat	tcaccctcag	ggattgttaac	agtcttctctg	gagtaactgg	aacttgcaag	360
35	gaaacattta	attttgacta	ttatgaaaca	gactatgaca	ctggcaggaa	tataagagaa	420
	aaactctatg	taaaaataga	caccatttgc	gcagatgaaa	gttttaccac	aggtgcacct	480
	ggtgaaagaa	agatgaagct	taacactgag	gtgagagaga	ttggaccttt	gtccaaaaag	540
	ggattctatc	ttgcctttca	ggatgtaggg	gcttgcatag	ctttggtttc	tgctaaaagtg	600
	tactacaaga	agtgctggte	cattatttgag	aaacttageta	tctttccaga	tactgatcgt	660
40	ggttcagaat	tttctctttt	agtcagaggt	agggggacat	gtgtcagcag	tgacagagaa	720
	taagcgggaaa	acgccccacg	gatgcactgc	agtgcagaag	gagaatgggt	agtgcccat	780
	ggaaaatgta	tctgcaaaag	aggctaccag	caaaaaggag	acacttgtga	accctgtggc	840
	ctgtgggtct	acaaagtctc	ctctcaagat	cttcagtgct	ctggtgtgtc	aaactcacagt	900
	ttttctgata	aagaaggctc	ctccagatgt	gaatgtgaag	atgggtatta	cagggtctca	960
45	tctgaccacac	catacgttgc	atgcacaagg	ctcccatctg	caccacagaa	ctctattttc	1020
	aaacatcaacc	aaacacacagt	aagtttggaa	tggaagtctc	ctgcagacaa	tgggggaaga	1080
	aacgatgtga	ctacacagaat	attgtgtaag	cggtgcagtt	gggagcaggg	cgaaatgtgt	1140
	ccctgtggga	gtaacatttg	atacatgcc	cagcagactg	gatttagagga	tactatgtct	1200
	actgtcatgg	acctgcctagc	coacgctaat	tatacttttg	aagttgaaag	tgtaaatgga	1260
50	gtttctgaat	taagccgtac	coagaggctc	tttgcgtctg	tcagttctac	caactggtca	1320
	gcagctccct	ccgaagtgag	tggaagtaag	aaggagagag	tactgcagcg	gagtgctcag	1380
	cttctctggc	aggaaccaga	gcattccaat	ggagctcatc	cagaatatga	aatcaagtat	1440
	tacagagaag	atcaaaaggga	acgggaactac	tcaacagttaa	aaacccaagt	taacttcagc	1500
	tgatttaata	atcttgaaac	aggaacagtg	tatgttttcc	agattctggg	ttttactgtg	1560
55	ctgtggttat	gaaattacag	tcccagactt	gatgttgtta	caatagagga	agctcacaggt	1620
	aaaatgtttg	aagcttacaag	tgctctccagt	gcacagaatc	ctgttattat	ctatgctgtg	1680
	gttgctgtag	ctgggaacct	cattttgggt	ttcatggctt	ttggcttcat	caattgggga	1740
	aggcactgtg	gttatagcaa	agctgaccac	gaaggcgatg	aagagcttta	ctttctattt	1800
	aaatttccag	gcacccaacac	ctacattgac	ctgaaacact	atgaggagcc	aaatagagct	1860
60	gtccatcaat	tcggcaagga	gtagatggc	tctgtgatta	aaattgagcg	tggtgatgtg	1920
	gcaggagaat	tcgggtgaagt	ctgcagtgcc	cgtttgaac	ttccaggggaa	aagagatgtt	1980
	gcagtagcca	taaaaaccct	gaaagttggt	tacacagaaa	aaacaaaggag	agactttttg	2040

[illegible]

	tctcggggag	aggaggttta	tgtgaagaag	acgatggggc	gtctccctgt	ggcgtggatg	3060
	gccatgtgag	ccctgaacta	cagtgtctat	accaccaaga	gtgatgtctg	gtcctttgga	3120
	gtccctcttt	ggggagatag	gagccttgga	ggtaacacct	actgtggcat	gacctgtgcc	3180
	gagctctatg	aaaagctgoc	ccagggtac	cgcattggagc	agcctcgaaa	ctgtgacgat	3240
5	gaagtgtacg	agctgatgoc	tcagtgtcgg	cgggaccgtc	cctatgagcg	accccccctt	3300
	gccacgatgt	ctctacagct	aggccgcatg	ctggaaagcca	ggaaggcccta	tgtgaacatg	3360
	tcgctgtttg	agaacttcac	ttacgcgggc	attgatgcca	cagctgagga	ggcctga	3417
10	<210> 9						
	<211> 3375						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
15	<300>						
	<302> TEK						
	<310> L06139						
20	<400> 9						
	atggactcct	tagccagctt	agttctctgt	ggagtcagct	tgtctccttc	tggaaactgtg	60
	gaaggtgcc	tggacttgat	cttgatcaat	tcctacctc	ttgtatctga	tgctgaacaa	120
	ctctctcact	gcatttccct	tgggtggcgc	ccccatgagc	ccatcaccat	aggaaggagc	180
	tttgaagcct	taatgaacca	gcaccaggat	ccgctggaaag	ttactcaaga	tgtgaccaga	240
	gaatgggcta	aaaaagttgt	ttggaagaga	gaaaaggcta	gtaagatcaa	tggtgcttat	300
25	ttctgtgaag	ggcgagttcg	aggagaggca	atcaggatcac	gaaccatgaa	gatcgctcaa	360
	caagcttcct	tcctcacagc	tactttaact	atgactgtgg	acaagggaga	taacgtgaa	420
	atatctttca	aaaaggtatt	gattaaagaa	gaagatgcag	tgatttcaaa	aaatggttcc	480
	ttcatccatt	cagtgccccg	gcataagata	cctgatattc	tagaagatac	cctgcctcat	540
	gctcaccccc	aggatgctgg	agtgtactcg	gccagggtata	taggaggaaa	ccctttcacc	600
30	tcggccttca	ccagggtgat	agtcgggaga	tgtgaagccc	agaagtgggg	acctgaatgc	660
	aacctactct	gtactctgtg	tatgaacaat	gggtctctgc	atgaagatac	tggagaatgc	720
	attttgcctc	ctgggtttat	gggaaggagc	tgtgagaagg	cttgtgaact	gcacacgttt	780
	ggcagacact	gtcaagaact	gtcagtgcca	caagagggga	gcaagtctta	tgtgttctga	840
	ctccctgacc	cctatgggtg	ttctctgtgc	acagggtgga	agggctgtca	gtgcaatgaa	900
35	gcattgccac	ctgggtttta	cgggccagat	tgtaagctta	gggtgcagctg	caacaatggg	960
	gagatgtgtg	atcgcttcca	aggatgtctc	tgctctccag	gatggcaggg	gctccagttg	1020
	gagagagaag	gcataccagc	gatgacccca	aaagatagtg	attgtccaga	tcatatagaa	1080
	gtaaaacagt	gtaaaatttaa	tcocatttgc	aaagctctct	gtggcgctct	acctactaat	1140
	gaagaataatg	ccctgtgtgaa	gcgggatggg	acagtgctcc	atccaaaaga	ttctaaccat	1200
40	acggatcatt	cttcagtgta	catattccac	atccaccgga	tcctcccccc	tgactcagga	1260
	gtttgggtct	gcagtggtgaa	cacagtggct	gggatgtgtg	aaaagccctt	caacattctt	1320
	gtttaaagct	tcctcaagcc	cctgaatgcc	ccaaaagctga	ttgacactgg	acataattct	1380
	gctgtcatca	acatcagctc	tgagccttac	tttggggatg	gaccaatcaa	atccaaaga	1440
	cttctatata	aaccogtttaa	tcactatgag	gcttggcaac	atatccaagt	gcacaaatga	1500
45	attgttacac	tcaactattt	ggaacctcgg	acagaatatg	aaactctgtg	gcaactgtgtc	1560
	cgctgtggag	agggtgggga	aggcatctct	ggacctgtga	gaagcttca	aacagcttct	1620
	atcggaatcc	ctctcccaag	aggcttaaat	ctcctgctca	aaagtccagc	caactctaat	1680
	ttgacatgct	aaccaatatt	tccaagctcg	gaagatgaat	tttatgttga	gtgacagaga	1740
	aggctctgtg	aaaaaagtga	tcagcagaat	attaaagttc	caggcaactct	gagcttcggtg	1800
50	ctacttaaca	acttaccatc	caggagagcag	tacgtgtgac	gagctagagc	caacaccaag	1860
	gcccaggggg	aatggagtga	agatctcact	gcttgggacc	ttagtgacat	tcttctctct	1920
	caaccagaaa	acatccaagt	ttccaacatt	acacactcct	cggtgtgtat	ttcttggaca	1980
	atatgtgatg	gctattctat	ttcttctatt	actactcagt	acaaggttca	agccaagaat	2040
	gaagaccagc	acgtgtgatg	gaagataaag	aatgccacca	tcattcagta	tcagctcaag	2100
55	ggccttagag	ctgaacaagc	ataccagggt	gacatttttg	caagagaaca	catagggtca	2160
	agcacaaccag	ctcttttctca	tgaactgttg	accctccagc	aatctcaagc	accagcgga	2220
	ctcgaggggg	ggaagatgct	gcttatagcc	atccttggct	ctgtcggaat	gacctgtcgt	2280
	actgtgtcgt	tggtcctttct	gatcatattg	caattgaaga	gggcaaatgt	gcaagggaga	2340
	atggccccaag	ctctcccaaa	cgtgagggaa	gaaccacgctg	cataggttcaa	ctcagggaat	2400
	ctggccctcaa	acagggaaggt	caaaaacac	ccagatccta	caatttatcc	agtgcttgac	2460
60	tggaatgaca	tcaaatttca	agatgtgatt	ggggagggca	attttggcca	agttctctaa	2520
	gcgcgatca	agaaggatgg	gttaccgatg	gatgctgcca	tcaaaagaat	gaaagaatat	2580

<211> 3147
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5 <300>
 <302> alpha v intergrin
 <310> NM0022210

<400> 12
 10 atggccttttc cgccgcggcg acggctcgcc ctcggctccc gcggcctccc gcttctttctc 60
 tccgggactcc tgctacctct gtgcgcgcgc ttcaacctag acgtggacag tctgtccgag 120
 tactctggcc ccgaggggaag ttacttcggc ttgcgcgtgg atttctctgt gccacgacgg 180
 tcttcccggga tgtttcttct cgtgggagct cccaagcaa acaccacca gctctgggatt 240
 gtggaaggag ggcaggtctc caaatgtgac tggctctcta ccgcgcgggt ccagccaatt 300
 15 gaatttgatg caacaggcaa tagagattat gccaggatg atccattgga atttaagtcc 360
 catcagtggt ttggagcatc tgtgaggtcg aaacaggata aaattttggc ctgtgcccga 420
 ttgtaccatt ggagaactga gatgaaacag gagcgagagc ctgttggaac atgctttctt 480
 caagatggaa caaagactgt tgagtatgct ccatgtagat cacaagatat tgatgtgat 540
 ggaacaggat tttgtcaagg aggattcagc attgatttta ctaaagctga cagagtaact 600
 20 tctggtggct ctggtagctt ttattggcaa ggctcagctta ttctggatca agtggcagaa 660
 atcgatatcta aatacagacc caatgtttac agcatcgaat ataataacca attagcaact 720
 cggactcgac aagctatttt tgatgcagagc tatttggggt atctcttggtg tgtcggagat 780
 ttcaatgggt atggcctaga tgactttgtt tcaggagttc caagagcagc aaggactttg 840
 ggaatgggtt atatttatga tgggaagaac atgtctctct tacaattt tactggcgag 900
 25 cagatggctg catatttogg attttctgta gctgcoactg acattaatgg agatgattat 960
 gcagatgtgt ttattggagg acctctcttc ttggatctgt gctctgatgg caaactccaa 1020
 gaggtggggc aggtctcagt gtctctacag agactctcca gacgacaaag 1080
 ctgaatggat ttgagctctt tgcacggttt ggcagtgcca tagctctctt gggagatctg 1140
 30 gacacagtag gtttcaatga tattgcaatt gctgctccat atgggggtga agataaaaaa 1200
 ggaatttgtt atactctcaa tggaaagatc acaggcttga accgagctcc atctcaaatc 1260
 ctggaaggcg agtgggtcgc tgaagcagtg ccaccaagct ttgctattc aatgaaaggga 1320
 ccgcacagata tagacaaaaa tggatatcca gacttaattg taggagcttt tgggttagat 1380
 cgaactatct tatcacaggc cagaccagtt atcactgtaa attgctggtc tgaagtgtac 1440
 cctagcattt taaatcaaga caataaaacc tgcctcactgc ctggaaacagc tctcaaaagt 1500
 35 tctgttttta atgttagggt ctgcttaaaag gcagatggca aaggagtact tcccaaggaa 1560
 cttaatttcc aggtggaact tcttttggat aaactcaagc aaaagggagc aattcgagca 1620
 gcactgtttc tctacagcag gtccccaagt cactccaaga acatgctatg attagaggag 1680
 agctgtagtc agtgtgagga attgatagcg tatctgcggg atgaattgga tttagagac 1740
 40 aaactcactc caattactat ttttatggaa ttatgggttg attatagaac agctgtgcat 1800
 accaacaggct tgcaccccat tcttaaccag ttcacgctcg caacacttag tcgacaggct 1860
 cacattctac ttgactgtgg tgaagacaat gtctgtaaac ccaagctgga agttttctga 1920
 gcagtgatgc aaaaagaagt ctatattggc gtgatacaac ctctgaactt gatgttgaag 1980
 gctcagaatc aaggagaagg tgcctacgaa gctgagctca tegtttccat tccactgcag 2040
 45 gctgatttca tcggggttgt ccgaacaat gaagctctga caagacttct ctgtgactt 2100
 aagacagaaa accaaactcg ccagggtgga tgtgaccttg gaaaccaact gaaggctgga 2160
 actcaactct tagctggctc tegtltcagt gtgcaccagc atcgacagat ggaactctct 2220
 gtgaaatttg acttacaagt ccaaagctca atctatttg acaaagttaag ccaagtgtga 2280
 50 tctocaaaag ttgatcttgc tgttttagct taagaggagt atcgagctct ctgagctct 2340
 gatcatatct ttcttccgat tccaaactcg gagcaaaag agaacctgga gactgaagaa 2400
 gatgttgggc cagttgttca gcacatctat gagctcgaaa acaatggtcc aagtctcaat 2460
 agcaaggcaa tgcctcatct tcaagtggct tacaataata ataataacac tctgttgtat 2520
 actctcatt atgatattga tggaccaatg aactgcactt cagatattgga acatccact 2580
 ttgagaatta agatctctac tttgcaaaac aotgaaaaga atgacacggg tgcggggcaa 2640
 55 ggtgagcggg acctctctat caataagcgg gatcttgccc tcaagtgaag agatattcac 2700
 attctggggt gtggagttgc tcaagtgtct gaagatttgt gccaaagtgg gagattagac 2760
 agaggaaaag gtgcaactct tgaactaaag tcaattactgt ggaactgagc ttttatgaat 2820
 aagaaaaatc agaatctatc ctattctctc aagtcgtctg atctcattaa tgtcatagag 2880
 ttctcttata agaactcttc aattgaggat atcaccaact ccaacttggt taccactaat 2940
 60 gtcactggcg gcatctacgc cctgtgcggc cctgtgcgtg ttgggtattg cacttataga 3000
 gtctacagag gattgttgtct actggtgttt ttggtatttg taagttaacg gatgggcttt 3060
 tttaaacggg tccgggcacc tcaagaagaa caagaaaggg agcagcttca acotcatgaa 3120
 aatggtgaag gaaactcaga aacttaa 3147

acatcttcca gtcaagctcg taaatacgtg aatgcattct cagcccgagc gctggctatg 1920
tga 1923

5 <210> 15
<211> 544
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10 <300>
<302> c-myc
<310> J00120

15 <400> 15
gacccccgag ctgtgctgct cgcggcgcgc acgcgcgggc cccggcgcgc cctggctccc 60
ctcctgcctc gagaaggcca gggcttctca gaggcttggc gggaaaaaga acggaggagag 120
ggatgcgcgt gaggataaaa gccggtttcc ggggctttat ctaactcgct gtatgaattc 180
cagcgagagg cagagggagc gagcggcgcc cgggctaggc tggaaagagc gggcgagcag 240
agctgcgcct cgggcgtctc gggaaaggag atccggagagc aatagggggc ttgcctctgt 300
20 gccagccct cccgtgctc cccagccag cggctcccaa cccttgcgc atccacgaaa 360
ctttgcccat agcagcgggc gggcactttg cactggaact tacaacacc gcgaaggagc 420
gcgactctcc cgcagcgggc aggcctattct gccctattgg ggacacttcc ccgcgcgtgc 480
caggaccgcc ttctctgaaa ggcctctcct gcagctgctt agacgtgga ttttttttcg 540
gtag 544

25 <210> 16
<211> 618
<212> DNA
<213> Homo sapiens

30 <300>
<302> ephrin-A1
<310> NM004428

35 <400> 16
atggagttcc totgggcgcc totcttgggt ctgtgctgca gtctggcgcc tgctgatcgc 60
cacaccgtct totggaacag ttcaaatccc aagtctcgga atgaggacta caccatacat 120
gtgcagctga atgactacgt ggacatcctc tgtccgcact atgaagatca cctctgtggca 180
40 gacgctgcga tggagcagta catactgtac ctgggtggagc atgaggagta ccagctgtgc 240
cagcccccagt ccaaggacca agtccgcctgg cagtgcaccc ggcccagtcg caagcatggc 300
ccggagaagc tgtctgagaa gtcccagcgc ttcaacacct tcacctggg caaggagttc 360
aaagaaggac acagctacta ctacatctcc aaacccatcc accagcatga agaccgtctgc 420
ttgaggttga aggtgactgt cagtggcaca atcactcaca gtccctcagg ccattgtcaat 480
45 ccacaggaga agagacttgc agcagatgac ccagaggtgc ggggttctaca tagcatcggt 540
cacagtgcgt cccacgcctc ctcccaactt gctctggactg tgctgctcct tccactctgt 600
ctgctgcaaa ccccgctga 618

50 <210> 17
<211> 642
<212> DNA
<213> Homo sapiens

55 <400> 17
atggcgccgc cgcagcgccc gctgctccgc ctgctgctcc tgctgttacc gctgcgcgcg 60
ccgcctctcg cgcgcgcgca ggacgcgcgc cgcgcaccaat cggaccgcta cgcgccttac 120
tggaacccag gcaaccaccg gtccacgcga ggcgcggggc acgacggggc gggctacaag 180
gtggaggtga gcatcaatga ctacctggac atctactcgc gcgactatgg ggcgcgcgtg 240
60 cgcgcggcgc agcgcgatga gcaactacgt ctgtacatgg tcaacggcga gggccacgcc 300
tcctgcgacc acgcgcagcg cggcttcaag cgtgggagc gcacccggcc cgcgcgcgcc 360
ggggggcgcc tcaagttctc ggagaagttc cagctcttca cgcctcttcc cctgggcttc 420

```

gagttctggc cggcccaaga gtattactac atctctgcc cgcctcccaa tgcgtggac 480
cggccctgcc tgcgactgaa ggtgtacgtg cggccgacca acgagaccct gtacgaggct 540
ctcagaccga tcttcaccag caataactcg tctagcagcc cggcgcggtg ccgcctcttc 600
ctcagaccga tccccgtgct ctggaccctc ctgggttctt ag 642

5
<210> 18
<211> 717
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10
<300>
<302> ephrin-A3
<310> XM001787

15
<400> 18
atggcgccgg ctcgcgtgct gctgctgctg ctgctcgtgc cgtgcccgtg gtcgccgctg 60
ctggcccaag ggcccgaggg ggcgctggga aaccggcatg cgtgtgtact gaacagctcc 120
aaccagcacc tgcggcgaga gggctacacc gtgcaggatga acgtgaacga ctatctggat 180
20 atttactgcc cgcactacaa cagctcgggg gtggggcccg gggcgggacc gggggccgga 240
ggcgggggcag agcagtagct gctgtacatg gtgagccgca acggtctacc cactgtcaac 300
gccagccaggt gctccaagcg ctgggagtg c aaccggccgc acgcccgcga cagcccatc 360
aagtctctcg agaagttcca gcgctacagc gccttctctc tgggctacga gtccaacgcc 420
ggccacagagt actactacat ctccacgccc actcacaacc tgcactggaa gtgtctgagg 480
25 atgaagtggt tcgtctgctg cgctccaca tcgcaactcg gggagaagcc ggctcccact 540
ctccccagct tcaccatggg ccccaatatg aagatcaacg tgcgtggaaga ctttgaggga 600
gagaaccctc aggtgcccga gcttgagaag agcatcagcg ggaccagccc caaacgggaa 660
cacctgcccc tggcgtggg catcgccctc ttctctatga cgttcttggc ctctctag 717

30
<210> 19
<211> 606
<212> DNA
<213> Homo sapiens

35
<300>
<302> ephrin-A3
<310> XM001784

40
<400> 19
atgcggctgc tgccctgctc gcggactgtc ctctgggccc cgttccctcg ctcctctctg 60
cgcgggggct ccagcctccg ccacgtagtc tactggaaac ccagtaaccc cagggtgctt 120
cgaggagacg ccgtgggtga gctgggccc c aacgattacc tagacattgt ctgccccac 180
tacgaaggcc caggggcccc tgagggcccc gagacgtttg ctttgtacat ggtggactgg 240
45 ccaggctatg agtctgccca ggagagggc ccccgggcct acaagcgctg ggtgtgctcc 300
ctgccctttg gccatgttca attctcagag aagattcagc gcttccaccc cttctccctc 360
ggctttgagt tcttacctgg agagacttac tactacatct cgttgcccac tccagagagt 420
tctggccagt gcttgaggct ccaggtgtct gtctgctgca aggagaggaa gtctgagtca 480
gccatctctg ttgggagccc tggagagagt ggcacatcag ggtggcgagg gggggacact 540
50 cccagccccc tctgtctctt gctattactg ctgctctga ttctctgctc tctcgcaatt 600
ctgtga 606

55
<210> 20
<211> 687
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<300>
<302> ephrin-A5
60 <310> NM001962

```

[illegible]

[illegible]


```

5 <210> 25
  <211> 1041
  <212> DNA
  <213> Homo sapiens

<300>
<302> ephrin-B1
10 <310> NM004429

<400> 25
atggctctggc ctgggcagcg ttggctcgcc aagtggcttg tggcgaatg cgtgtggggc 60
ctgtgcccgc tcgccacacc gctggccaa gctggcgagc agtatcttc cgtgtccctc 120
aaccocaaag tctgtagtg gaaggcctt ggtgatctac cgaaaatttg agacaagctg 180
gacatcatct gcccccgcgc agagacgggg tgcctctagc acgccactcg accocaaagt cgtgtgtacc 300
gtgcgaatagg ccagagcagg aatacgcctt accatcaagt tccaggagtt cggccccaac 360
tacatggggc tggagttcaa gaagcaccat gattactaca ttacctcaac atccaatgga 420
agcctggagg ggtctgaaaa ccggggaggc ggtgtgtgcc gcacacgcac catgaagatc 480
atcatgaagg ttgggcaaga tcccaatgct gtgacgcctg agcagctgac taccagcagg 540
ccagcgaagg aggcagacaa cactgtcaag atggccacac agggccctcg tagtcggggc 600
tccctgggtg actctgatgg caagcatgag actgtgaacc aggaagagaa gagtggccca 660
gggtcaagtg ggggcagcag cggggaccc t gatggcttct tcaactccaa gtgtggcatg 720
ttcggcgctg tccgtgcggc ttgcgtcact ttccgtctca tcatcatctt cctgaaggct 780
ctactactga agctacgcaa gcggcacccg aagcacacac agcagcggcc gctgcctccc 840
tcgctcagta cctcgcccag tcccaagggg ggcaagtggc cagcggccac cgagcccaag 900
gacatcatca ttcccttacc gactacagag aacaactact gcgcccaatc cgtgaaggct 960
agtggggact acgggcaccc tgtctacatc gtccaagaga tgcgcgcccc gagcccgccg 1020
aacatctact acaaggtctg a 1041

<210> 26
  <211> 1002
  <212> DNA
  <213> Homo sapiens

<300>

<400> 26
atggctctga gaagggaact cgtgtggaag tactgtcggt gtgttttgat ggtttttatgc 60
agaactctga tttccaaatc gatagcttcta gacccatctc attggaatcc ctcggaactcc 120
aaattttcac ctggacaagg tactggtacta taccacagag taggagacaa attgatatat 180
atttgcccaa aagtggactc taataactgtt gcccagtatg aaatattatac atgtttatat 240
gttgataccc accaagcaga cagatgcact cattaagaag gtctctccaa cttctccaa 300
tgtgcgaacc cagaccaaga tatcaaatc accatcaagt tccaagaatt cagccctcaa 360
ctctgggggtc tagaatttca gaagaacaaa gattattaca ttatctctac atcaaatggg 420
tctttggagg gccctggaata ccaggagagga ggggtgtgcc agacaagagc catgaagatc 480
ctcatgcaag ttggacaata tgcgaagttct ggtggatcaa ccaggaaataa agatccaaca 540
agacgtcaag aactagaagc tggtaacaa t ggaagaagtt ccacacaag acacaaatc 600
aaacccaaat caggttctag cacagacggc aacagcgccg gacatctggg gaacaacatc 660
ctcgggtccg aagtggccctt atttgcagag atgtctcag gatgcatcat ctctatctgc 720
atcatcatca cgtctggcgt cctcttgtct aagtaccgga ggagacacag gaagcactgc 780
ccgcgacata ccgacacgct gtcgctcagc acactggcca caccocagcg cagcgccaac 840
aacacaggct cagagcccg agacttatc atcccgctaa ggactcggga cagcgtcttc 900
tgccctcact acgagaaggt acggcgccac tccgggcacc cgtgtgtacat cgtccaggag 960
atgccccccg agagcccgcc gaacattttac tacaaggctc ga 1002

60 <210> 27
  <211> 1023
  <212> DNA

```


[illegible]

tcatacagctg gactcagagac tcacaaatgagc aagagagacag gacagcagatg ctggaacaaa ggcacagctg 3780
gacacagagag gactcagagag gacacagagag gacacagagag gacacagagag gacacagagag gacacagagag 3840

5

<210> 31
<211> 1318
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10

<310> UPR (urokinase-type plasminogen activator receptor)
<310> XM009232

15

atgggtccac ccgcgtctgt gttgaaagac gttgaaagac gttgaaagac gttgaaagac gttgaaagac 60
ccacatcgct acacatcgct acacatcgct acacatcgct acacatcgct acacatcgct acacatcgct

20

gagacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc 360
gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc

25

gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc 420
gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc

30

gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc 480
gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc

35

gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc 540
gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc gacacacatc

40

<210> 32
<211> 636
<212> DNA
<213> Homo sapiens

45

<310> BM
<310> U1811

50

atggctctctg agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 60
tgcacatctctt ctacatctctt ctacatctctt ctacatctctt ctacatctctt ctacatctctt ctacatctctt

55

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 120
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

60

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 180
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

65

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 240
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

70

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 300
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

75

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 360
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

80

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 420
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

85

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 480
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

90

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag 540
agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag agagagagag

<210> 33

	<211> 579								
	<212> DNA								
	<213> Homo sapiens								
5	<300>								
	<302> Bax alpha								
	<310> L22473								
	<400> 33								
10	atggacgggt cggggagca gccagagggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60								
	aagacagggg ccccttttgc tcaagggtttc atccaggatc gagcaggggc aatggggggg 120								
	gaggcaccgg agctggccct ggacccgggtg cctcaggatg cgtccaccacaa gaagctgagc 180								
	gagtgcttca agcgcacatcg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240								
	gcgcgcgtgg acacagactc ccccgagag gtctttttcc gagtggcagc tgacatgttt 300								
15	tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtgcaccttt tctactttgc cagcaaaactg 360								
	gtgtctcaagg cctgtgcac caaggtgccc gaactgatca gaacctcat gggctggaca 420								
	ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accagggtgg tggggacggc 480								
	ctcctctcct accttgggac gccacgtgg cagaccgtga ccatctttgt ggcgggagtg 540								
	ctcaccgcct cgtccacat ctgggaagaag atgggctga 579								
20									
	<210> 34								
	<211> 657								
	<212> DNA								
25	<213> Homo sapiens								
	<300>								
	<302> Bax beta								
	<310> L22474								
30									
	<400> 34								
	atggacgggt cggggagca gccagagggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60								
	aagacagggg ccccttttgc tcaagggtttc atccaggatc gagcaggggc aatggggggg 120								
	gaggcaccgg agctggccct ggacccgggtg cctcaggatg cgtccaccacaa gaagctgagc 180								
35	gagtgcttca agcgcacatcg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240								
	gcgcgcgtgg acacagactc ccccgagag gtctttttcc gagtggcagc tgacatgttt 300								
	tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtgcaccttt tctactttgc cagcaaaactg 360								
	gtgtctcaagg cctgtgcac caaggtgccc gaactgatca gaacctcat gggctggaca 420								
	ttggacttcc tccgggagcg gctgttgggc tggatccaag accagggtgg tggggtgaga 480								
40	ctcctcaagg ctcctcacc ccaccaccgc gccctcacea cgcgccctgc cccaccgtcc 540								
	ctgccccccc caactctct gggacccttg gccttctgga gcaggtcaca gtgtgtccct 600								
	ctccccatct tcagatcatc agatgtggct tataatgcgt tttccttaag tgtctga 657								
45									
	<210> 35								
	<211> 432								
	<212> DNA								
	<213> Homo sapiens								
50	<300>								
	<302> Bax delta								
	<310> U19599								
	<400> 35								
55	atggacgggt cggggagca gccagagggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60								
	aagacagggg ccccttttgc tcaagggtttc attgcgcgc tggacacaga ctcctcccga 120								
	gaggtctttt tccgagtggc agctgacatg ttttctgacg gcaacttcaa ctggggccgg 180								
	gtgtgcgcct tttctactt tgccagcaaaa ctgggtgtca aggcctctgt caccagaagt 240								
	cgggaactat tagaaccat catgggctgg acattggaat tctccggga gcggctgttg 300								
60	ggctggatcc aagaccaggg tggttgggac ggctctctct cctactttgg gacggccaa 360								
	tggcagacgg tgaccatctt tgtggcggga gtgctcacc cctcgctcac catctggaag 420								
	aagatgggct ga 432								

<210> 36
 <211> 495
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <300>
 <302> Bax epsolin
 10 <310> AF007826

 <400> 36
 atggacgggt cgggggagca gccacagaggc gggggggccca ccagctctga gcagatcatg 60
 aagacagggg ccccttttgc tccagggttcc atccaggatc gagcaggggc aatggggggg 120
 15 gaggcacccc agctggccct ggaccgggtg cctcaggatg cgtccaccaa gaagctgagc 180
 gagtgtctca agcgcacatcg ggacgaactg gacagtaaca tggagctgca gaggatgatt 240
 gccgcgctgg acacagactc ccccggagag gtctttttcc gagtggcagc tgacatgttt 300
 tctgacggca acttcaactg gggccgggtt gtgcgccctt tctactttgc cagcaaaactg 360
 gtgtccaaag ctggcgatga atggcgatgat ctgggctcac tgcacacctc gctctctggg 420
 20 ttcaagcgat tcaactgcct cagcatccca aggagctggg attacaggcc ctgtgcacca 480
 aggtgccgga actga 495

 <210> 37
 <211> 582
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <300>
 <302> bcl-w
 30 <310> U59747

 <400> 37
 atggcgaccc cagcctcggc cccagacaca cgggctctgg tggcagactt tgtaggttat 60
 35 aagctgaggg agaagggtta tgtctgtgga gctggccccc gggagggccc agcagctgac 120
 ccgctgcacc aagccatgcg ggcagctgga gatgagttcg agaccgcctt ccggcgccacc 180
 ttctctgata tggcggtctca gctgcattgt acccaggctc cagcccaaga acgcttcacc 240
 caggtctccc acgaaactttt tcaaggggggc cccaactggg gccgccttgt agcctctctt 300
 40 gtctttgggg ctgcactgtg tgcctgagag gtcaacaagg agatggaaac actgggtggga 360
 caagtgcagg agtggatggg ggctacctg gagacgcggc tggctgactg gatccacagc 420
 agtggggggt gggcggaagt cacagctcta tacgggggac gggccctgga ggaggcgccg 480
 cgtctgcggg aggggaactg ggcacatcag aggacagtgc tgacgggggc cgtgggactg 540
 gggggccctg taactgtagg ggctttttt gctagcaagt ga 582

 <210> 38
 <211> 2481
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <300>
 <302> HIF-alpha
 50 <310> U22431

 <400> 38
 atggaaggcg ccggcgccgc gaacgacaag aaaaagataa gttctgaacg tcgaaaaaga 60
 aagctctcag atgcagccag atctcggcga agtaagaat ctgaagtttt ttatgagctt 120
 gctcatcagt tgccacttcc acataatgtg agttegcac ttgataaggc ctctctgatg 180
 aggcttacc aactctatctt cagctgtgag gctgtctcgg atgctgggtg ttggatat 240
 60 gaagatgaca tgaaagcaca gatgaattgc ttttatttga aagccttgga tggttttgtt 300
 atggtttctca cagatgatgg tgacatgatt tacattttctg ataattgtga caaatcacg 360
 ggattaaact agtttgaaact aactggacac agtgtgtttt atttttactca tccatgtgac 420

	catgaggaaa	tgagagaaat	gcttacacac	agaaatggcc	ttgtgaaaaa	gggtaaagaa	480
	caaaacacac	agcgaagcct	ttttctcaga	atgaagtgtg	cctaactatg	cagaggaaga	540
	actatgaaca	taaggtctgc	aacatggaag	gtattgcact	gcacaggcca	catccaogta	600
	tatgatacca	acagtaacca	acctcagttg	gggtataaga	aaccacctat	gacctgcttg	660
5	gtgctgattt	gtgaacccat	tcctcaccca	tcaaatattg	aaattccctt	agatagcaag	720
	actttctcca	gtcgacacag	ctcggatatt	aaattttctt	attgtgatga	agaaattacc	780
	gaattgatgg	gatatgagcc	agaagaactt	ttaggccgct	caatttatga	atatatatcat	840
	gctttggagc	ctgtatcatct	gacccaaact	catcatgata	tgtttactaa	aggacaagtc	900
	accacaggac	agtacaggat	gcttgcccaa	agaggtggat	atgtctgggt	tgaaactcaa	960
10	gcaactgtca	tatatcaaac	caagaattct	caaccacagt	gcattgtatg	gcagacaact	1020
	gtgtgaggtg	gtattattca	gcacgacttg	attttctccc	ttcaacaaac	agaaattgttc	1080
	cttaaacccg	ttgaattctt	agatatgaaa	atgaactcag	tattcaacaa	agttgaatca	1140
	gaagatacaa	gtagcctctt	tgacaaactt	aagaaggaa	ctgatgcttt	aaactttgctg	1200
	gccccagccg	ctggagacac	aatcatatct	ttagattttg	gcagcaacga	ctcagaaact	1260
15	gatgaccagc	aacttgagga	agtaccatta	tataatgatg	taattgctccc	ctcacccaac	1320
	gaaaaattac	agaattataa	tttggcaatg	tctccattac	ccacogctga	aacgccaaag	1380
	ccactctgaa	gtagtctgga	ccctgcactc	aatcaagtaa	ttgcattaaa	attagaccaa	1440
	aatccagagt	cactggaaact	ttcttttacc	atgccccaga	ttcaggatca	gacacttagt	1500
	cttctcagtg	gaagcactag	acaaaagtca	ctcggagccta	atagtcccg	tgtaatatgt	1560
20	ttttatgtgg	atagtgtatg	gggtcaatgaa	ttcaagtctg	aatgtgtgta	aaaaactttt	1620
	gtcgaagaca	cagaagacaa	gaacccattt	tctactcagg	acacagattt	acactctggag	1680
	atgttagctc	ccatatatccc	aatggatgat	gacttccagt	tacgttccct	cgatcagttg	1740
	tcaccattag	aaagcagttc	gcgaagccct	ctcggagcga	gtcctcaaat	cacagttaca	1800
	gtattccagc	agactcgaat	acagaagact	actgcttaag	ccaccactac	cactgccacc	1860
25	actgtagaat	taaaaaacag	gcacaaaagac	cgataggagg	acattaaaaa	attgtattga	1920
	tctccatctc	ctaccacacat	acataaagaa	actactagtg	ccacatcatc	accatataga	1980
	gataactcaa	gtcggagacg	ctcacccaa	agagcaggaa	aaggagtgta	agaacagaga	2040
	gaaaaattct	ctccaaagag	ccctaactgt	ttactctctg	ctttgagtg	aagaactaca	2100
	gttctctgag	aagaactaaa	tccaaagata	ctagcttttg	agaattgtct	gagaagcga	2160
30	aaaatgggac	atgatgtgtc	actttttcaa	gcagtaggaa	ttggaacatt	attcacagcg	2220
	ccagacgata	atgcagctac	tacatcactt	tcttggaagc	gtgtaaaaag	atgcgaactc	2280
	atggaacaga	atgggaatgga	gcacaaagaca	attatttttaa	taccctctga	tttagcatgt	2340
	agactgtctg	ggcaataaat	ggatgaaagt	ggattaccac	agctgaccag	tattgatgtg	2400
	gaagtttaatg	ctccatataca	aggcagcaga	aacctactgc	agggtgaaga	attactcaga	2460
35	gctttggatc	aagttaactg	a				2481

<210> 39
 <211> 481
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> ID1
 <310> X77956

	<400> 39						
	atgaaagtgc	ccagttggcag	caccggccacc	gccggccggg	gccccagctg	cgcgctgaag	60
	gccgggcaaga	cagcgagcgg	tgccggcgag	gtgggtgcgt	gtctgtctga	gcagagcgtg	120
50	gccatctcgc	gctgccgggg	cgccgggggc	cgccctgctg	ccctgtgtga	cgagcagcag	180
	gtcaaacctg	tgctctacga	catgaacggc	tgttactcac	gctcaaggga	gctgggtccc	240
	acccgtcccc	agaaacggcaa	ggtagacaa	gtggagattc	tccagcaact	catcgactac	300
	atcaggggac	ttcagttgga	gctgaactcg	gaatccgaag	ttgggacccc	cgggggccga	360
	gggtgcggcg	tcggggctcc	gctcagcacc	ctcaacggcg	agatcagcgc	cctgaaggcc	420
55	gaggcggcat	gctgtctcgc	ggacgatcgc	atcttgtgtc	gctgaatcgt	gaaaaaaaaa	480
	a						481

<210> 40
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> ID2B
 <310> M96843
 5
 <400> 40
 tgaaagcctt cagtcgccgtg aggtccatta ggaaaaacag cctgttgagc caccgcctgg 60
 gcatctccca gagcaaaacc ccggtggatg acctgatgag cctgctgtaa 110
 10
 <210> 41
 <211> 486
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 15
 <300>
 <302> ID4
 <310> Y07958
 20
 <400> 41
 atgaaggcgg tgagcccggt gcgcccctcg ggccgcgaagg cgccgtcggg ctgcggcgcc 60
 ggggagctgg cgtgcccgtg cctggccgag caccggccaca gcctgggtgg ctccgcagcc 120
 gcggcgcggg cgccggcgcc agcgcgctgt aaggcgggccg aggcggcgcc gcacgcagccg 180
 gcgctgtgcc tgcagtgcga tatgaacgac tgctatagcc gcctgcggag gctgggtgcc 240
 25
 accatccgcg ccaacaagaa agtcagcaaa gtggagatcc tgcagcacgt tatcgactac 300
 atctgggacc tgcagctggc gctggagagc caccgggcc tgcagagcca gccaccaccg 360
 ccgcgcgcgc cacaccacco ggccgggacc tgtccagccg cgccgcgcgc gaccccgctc 420
 actgcgctca acaccgaccc ggccggcgcg gtgaacaagg agggcgacag catctctgtc 480
 cgctga 486
 30
 <210> 42
 <211> 462
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 35
 <300>
 <302> IGF1
 <310> NM000618
 40
 <400> 42
 atgggaaaaa tcagcagctc tccaacccaa ttattttaagt gctgcttttg tgatttcttg 60
 aaggtgaaga tgcacacocat gtctctctcg catctctctc acctggcgct gtcctgtctc 120
 accttcacca gctctgccac ggctggagccg gagacgctct gcggggctga gctgggtgat 180
 45
 gctcttcagt tcgtgtgtgg agacaggggc ttttatttca acaagccaca agggataggg 240
 tccagcagtc ggaggcgccc tcagacagcc atcgtggatg agtgctgctt ccggagctgt 300
 gatctaagga ggctggagat gtattgcgca cccctcaagg ctgccaagtc agctcgctct 360
 gtccgtgcc ccgcgccac cgacatgcc aagaccacaga aggaagtaca tttagaagaac 420
 50
 gcaagtagag ggagtgcagg aaacaagaac tacaggatgt ag 462
 <210> 43
 <211> 591
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 55
 <300>
 <302> PDGFA
 <310> NM002607
 60
 <400> 43
 atgaggacct tggttgctt gctgctcttc ggctgcggat acctcgccca tggttctggcc 60

[illegible]

	actttctaca	gacctactt	cagaattggt	cgatttgacg	tctcagcaat	ggagaagaat	420
	gcttccaact	tggtgaaagc	agagttcaga	gtctttcggt	tgcagaacc	aaagccaga	480
	gtgcctgaac	aacggattga	gctatatcag	attctcaagt	ccaaagattt	aacatctcca	540
	accagcgct	accatcgacag	caaagtgttg	aaaacaagag	cagaaggcga	atggctctcc	600
5	ctogatgtaa	ctgatgtgtt	tcatgaatgg	cttcaccata	aagacaggaa	cctggggattt	660
	aaaataagct	tacactgtcc	ctgctgcact	tttgtaccat	ctaataatta	catcatccca	720
	aataaaagtg	aagaactaga	agcaagattt	gcaggtattg	atggcacctc	cacatatacc	780
	agtggtgatc	agaaaactat	aaagtccact	aggaaaaaaa	acagtgaggaa	gacccacat	840
	ctctcgctaa	tgttattgcc	ctctacaga	cttgagtcac	aacagaccaa	cggcggaag	900
10	aagcgctgtt	tggtatcgcc	ctattgcttt	agaaatgtgc	aggataattg	ctgcctacgt	960
	ccactttaca	ttgatttcaa	gagggatcta	gggtggaaat	ggatatacga	acccaagggt	1020
	tacaatgccca	actctgtgtc	tggagcatcg	ccgtatttat	ggagttcaga	catcagcac	1080
	agcagggttc	tgagcttata	taataccata	aatccagaag	catctgtctc	tccttctgtc	1140
	gtgtcccaag	atttagaacc	tctaaccatt	ctctactaca	ttggcaaac	acccaagatt	1200
15	gaacagcttt	ctaataatgat	tgtaaagtct	tgc aaatgca	gctaa		1245
	<210> 48						
	<211> 1239						
20	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> TGFbeta3						
25	<310> XM007417						
	<400> 48						
	atgaagatgc	acttgcaaa	ggctctgtgt	gtcctggccc	tgtgaaactt	tgccacggtc	60
	agcctctctc	tgtccacttg	caccaccttg	gacttcggcc	acatcaagaa	gaagagggtg	120
30	gaagccattc	ggggacagat	cttgagcaag	ctcagggtca	ccagcccccc	tgagccaacg	180
	gtgatgacct	acgtccctca	tcaggctcgt	gccttttaca	acagcaccgc	ggagcttctg	240
	gaggagatgc	atggggagag	ggaggaaggc	tgcacccagg	aaaacaccga	gtcggaaatc	300
	tatgccaaa	aaatccata	attcgacatg	atccaggggc	tgccggagca	caacgaaactg	360
	gctgtctgcc	ctaaaggaat	tacctccaag	gttttccgct	tcaatgtgtc	ctcagttggag	420
35	aaaaatagaa	ccaacctatt	ccgagcagaa	ttccgggtct	tgcgggtgcc	caacccccagc	480
	tctaagcgga	atgagcagag	gatcgagctc	ttccagatcc	ttcggccaga	tgagcacatt	540
	gccaaacagc	gctatatcgg	tgccaagaat	ctgccccac	ggggcactgc	cgagtgggtg	600
	tcctttgatg	tcactgcac	tgtgcgtgag	tggctgttga	gaagagagtc	caacttaggt	660
	ctagaaatca	gcatttactg	tccatgtcac	acctttcagc	ccaatggaga	tatcctggaa	720
40	aacatctcac	aggtgatgga	aatcaaatcc	aaaggcgtgg	acaatgagga	tgacccatgg	780
	cgtagagatc	tggggcgctc	caagaagcag	aaggatcacc	acaacctca	tctaatctctc	840
	atgatgatcc	ccccacaccg	gctcgacaac	ccgggccagg	ggggtcagag	gaagaagcgg	900
	gctttggaca	ccaattactg	cttcgcgaac	ttggaggaga	actgctgtgt	gcggccccctc	960
	tacattgact	tcgcacagga	tctgggctgg	aagtgggtcc	atgaacctaa	gggctactat	1020
45	gccaaactct	gctcaggccc	ttgcccatc	ctccgcagtg	cagacacaa	ccacagcacg	1080
	gtgctgggag	gtgtaaacac	tctgaacctc	gaagcatctg	cctcgctctg	ctcgctggccc	1140
	caggacctgg	agccctgtac	catctgttac	tatgttggga	ggacccccaa	agtggaagcag	1200
	ctctccaaca	tggtggtgaa	gtctgtgtaa	gttagctga			1239
50	<210> 49						
	<211> 1704						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
55	<300>						
	<302> TGFbetaR2						
	<310> XM003094						
60	<400> 49						
	atgggtctggg	ggctgctcag	gggectgtgtg	ccgtctgcaca	tcgtctctgtg	gacgcgtatc	60
	gctcagcagca	tcccacgcga	cgttcagaag	tcggttaata	acgacatgat	agtcactgac	120

	aacaacgggt	cagtcaagtt	tccacaactg	tgtaaatatt	gtgatgtgag	atattccacc	180
	tgtgacaccc	agaatccgt	catgagcaac	tgcagcatca	cctccatctg	tgagaagcca	240
	caggagctct	gtgtggctgt	atggagaaag	aatgacgaga	acataacact	agagacagtt	300
	tgccatgacc	ccaagctccc	ctaccatgac	tttatctctg	aagatgctgc	ttctccaaag	360
5	tgccattatga	agggaaaaaa	aaagcctggg	gagactttct	tcattgtgttc	ctgtagctct	420
	gatgagtga	atgacaacat	catcttctca	gaagaatata	acaccagcaa	tcctgacctg	480
	tttgtctatca	tatttcaagt	gacaggcatc	agcctcctgc	caccactggg	agttgccata	540
	ctgtctatca	tcattcttcta	ctgctaccgc	gttaaccggc	agcagaagct	gagttcaacc	600
	tgggaaaacc	gcaagacgag	gaagctcatg	gagttcagcg	agcaactgtgc	catcatcctg	660
10	gaagatgacc	gctctgacat	cagctccacg	tgtgccaaca	acatcaacca	caacaacagag	720
	ctgctgccca	ttgagctgga	cacctgggtg	gggaaaggct	gctttgtcta	gggtctataag	780
	gccaaagctga	agcagaacac	ttcagagcag	tttgagacag	tggcagtgcaa	gatctttccc	840
	tatgaggagt	atgctctctg	gaagacagag	aaggacatct	tctcagacat	caatctgaag	900
	catgagaaca	tactccagtt	cctgacggct	gaggagcgga	agacggagtt	ggggaaacaa	960
15	tactggctga	tcaccgcctt	ccacgccaag	ggcaacctac	aggagtaact	gacgcggcat	1020
	gtccatcagct	gggaggacct	gcgcaagctg	ggcagctccc	tcgccccggg	gattgtctac	1080
	ctccacaggt	atcacactcc	atgtggggagg	cccaagatgc	ccatcgtgca	cagggaacctc	1140
	aagagctcca	atatcctcgt	gaagaacgac	ctaacctgct	gcctgtgtga	ctttggggctt	1200
	tcctctcgctc	tggaacctac	tctgtctgtg	gatgacctgg	ctaacagtgg	gcaggtggga	1260
20	actgcacaag	acatggctcc	agaagtctcta	gaatccagga	tgaatttggga	gaatgtttgag	1320
	tccttcaagc	agaccgatgt	ctactccatg	gctctgtgtc	tctgggaaat	gacatctcgc	1380
	tgtaatgagc	tggggagaagt	aaaagattat	gagcctccat	ttggttccaa	gggtcggggag	1440
	caccctctgtg	tcgaagacat	gaaggacaac	gtgttgagag	atcgaggggc	accagaaatt	1500
	cccagcttct	gggtcaacca	ccagggcatac	cagatggtgt	gtgagacgtt	gactgaagtc	1560
25	tgggaccacag	accacagggc	cgctctcaca	gcccagtggt	tggcagaacg	ctctagtgag	1620
	ctggagcatc	tggaacaggt	ctcgggggagg	agctgctcgg	aggagaagat	tcttgaagac	1680
	ggctccctaa	acactaccaa	atag				1704
30	<210> 50						
	<211> 609						
	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
35	<300>						
	<302> TGFbeta3						
	<310> XM001924						
	<400> 50						
40	atgtctcatt	acaccattat	tgagaatatt	tgtcctaaga	atgaatctgt	gaaatcttac	60
	agtcaccaag	gagtgcaatt	tcctatcccg	caagctgaca	tggataagaa	gcgattccagc	120
	tttgtcttca	agcctgttct	caacacctca	ctgtctcttc	tacagtgtga	gctgacgctg	180
	tgtaacgaag	tggaagaagca	ccccacaga	ttgcttaagt	gtgtgcctcc	tgacgaagcc	240
	tgcaactcgc	tggaacgctc	gataatctgg	gccatgatgc	agataaagaa	gacgttcaact	300
45	aagccctctg	ctgtgatcca	ccatgaagca	gaatctaaga	aaaagggtcc	aagcatgaag	360
	gaaccaaatc	caattttctcc	accaattttc	catggctctg	acaccctaac	cgtgatgggc	420
	attcggtttg	cagcctttgt	gatcggagca	ctcctgacgg	ggggccttgt	gtacatctat	480
	tctcacacag	ggggagacagc	aggaaggcag	caagtcacca	cctccccgcc	agcctcgga	540
	aacagcagtg	ctgcccacag	catcggcgag	acgcagagca	cgccctgtct	cagcagcagc	600
50	acggcctag						609
	<210> 51						
	<211> 3633						
55	<212> DNA						
	<213> Homo sapiens						
	<300>						
	<302> EGFR						
60	<310> X00588						
	<400> 51						

[illegible]

	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<300>	
5	<302> ERRB4	
	<310> XM002260	
	<400> 54	
10	atgatgtacc tggagaagaag acgactcgtt catcgggatt tggcagccg taatgtctta 60	
	gtgaaatctc caaacatcgt gaaaatcaca gattttgggc tagccagact cttggaagga 120	
	gatgaaaaag agtacaatgc tgatggagga aagatgccc aaataggat ggctctggag 180	
	tgatacatt acaggaatc caccatcag agtgacgttt ggagctatgg agttactata 240	
	tgggaactga tgacctttgg aggaataccc tatgatggaa ttccaacgag agaaatccct 300	
15	gatttattag agaaaggaga acgtttgcct cagcctccca tctgcactat tgacgtttac 360	
	atggctatgg tcaaatgttg gatgatgtat gctgacagta gacctaatt taaggaaactg 420	
	gctgctgagt ttccaaggat ggctcgagac cctcaaatg acctagtat tcagggtgat 480	
	gatcgtatga agcttcccag tccaaatgac agcaagttct ttcagaatct cttggatgaa 540	
	gaggatattgg aagatatgat ggatgctgag gagtacttgg tccctcaggg tttcaacatc 600	
20	ccacctccca tctatacttc cagagcaaga atgtactcga ataggagtga aatggagac 660	
	agccctctct ctcgctacac ccccatgtca ggaacccagt ttgtataccg agatggagg 720	
	tttgcctgct aacaaggagt gtctgtgccc tacagagccc caactagcac aattccagaa 780	
	gctcctctgg cacagggtgc tactgttgag atttttgat actcctgctg taatggcacc 840	
	ctacgcaagc cagtggcacc ccatgtccaa gaggacagta gcaccagag gtacagtctc 900	
25	gacccccacc tgtttgcctc agaacggagc ccacgaggag agctggatga ggaaggttac 960	
	atgactctta tgcgagacaa acccaaacaa gaatacctga atccagtga ggagaacctc 1020	
	tttgtttctc ggagaaacaa tggagacctt caagcattgg ataactccga atatcacaa 1080	
	gcactcaatg gtccacccaa ggccgaggat gagtatgtga atagccact gtacctcaac 1140	
	accttctcca acaccttggg aaaagctgag tacttgaaga acaacatact gccacctcgg 1200	
30	gagaaggcca agaaagcgtt tgacaacctc gactactgga accacagcct gccacctcgg 1260	
	agcacccttc agcaccagaa ctacctgcag gagtacagca caaatatatt ttataaacag 1320	
	aatgggcgga tccggctcat tgtggcagag aatcctgaat acctctctga gttctccctg 1380	
	aagccaggca ctgtgctgac gctccacct tacagacacc ggaatactgt ggtgttaa 1437	
35	<210> 55	
	<211> 627	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
40	<300>	
	<302> FGF10	
	<310> NM004465	
	<400> 55	
45	atgtggaaat ggatactgac acattgtgac tcagccttcc cccacctgac cggtctgtgc 60	
	tgctcgtcgt tttttgttgt gttcttggtg tcttcctgac ctgtcaactg ccaagccctt 120	
	gtcagaggca tgggtgtacc agaggccacc aactctctct cctctcctct ctctctctct 180	
	tcacgacggg gaaggcatgt gcggagctac aatcactctc cctcagatgt ccgctggaga 240	
	aagctattct ctttcaccaa gtactttctc aagattgaga agaacgggaa ggctcagcgg 300	
50	accaaagaag agaactgccc gtacagcatc ctggagatga catcagtata aatcggaatt 360	
	gttgccgtca aagccattaa cagcaactat tacttgacca tgaacaagaa ggggaaactc 420	
	tatggctcaa aagaatttaa caatgactgt aagctgaagg agagataga ggaaaaatga 480	
	tacaatacct atgcatactt taactggcag cataatggga ggcaaatgta tgtggcattg 540	
	aatggaaaaa gagctcccaag gagaggacag aaaacacgaa ggaataaacac ctctgctcac 600	
55	tttcttccaa tgggtgtaca ctcatag	627
	<210> 56	
	<211> 679	
60	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	

<300>
 <302> FGF11
 <310> XM008660

5 <400> 56
 aatggcggcg ctggccagta gcctgatccg gcagaagcgg gaggtccggc agcccccggg 60
 cagccggccg gtgtcggcgc agcggcgcggt gtgtccccgc ggcaccaagt ccccttgcca 120
 gaagcagctc ctcatcctgc tgtccaaagg gcgactgtgc ggggggocgc ccgcggcgcc 180
 ggaccggcgc ccggagcctc agctcaaagg catcgtcacc aaactgttct gccgccaggg 240
 10 tttctacctc caggcgaatc ccgacggaaag catccagggc accccagagg ataccagctc 300
 ctccaccacc ttcaacctga tccctgtggg cctccgtgtg gtcaccatcc agagcgccaa 360
 gctgggtcac tacatggcca tgaatgctga gggagtgtgc tacagtctgc cgattttcac 420
 agctgagttg cgtcttaagg agtgtgtctt tgagaattac tacgtcctgt acgcctctgc 480
 tctctaccgc cagcgtcggt ctggccgggc ctggtacctc ggccctggaca aggaggccca 540
 15 ggtcatgaag ggaaaccgag ttaagaagac caaggcagct gccacctttc tgcccaagct 600
 cctggagggt gccatgtacc aggagccttc tctccacagt gtccccgagg cctccccctc 660
 cagtcacctc gccccctga 679

20 <210> 57
 <211> 732
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25 <300>
 <302> FGF12
 <310> NM021032

30 <400> 57
 atggctgcgg cगतगगगग ctctctgata cggcagaagc ggcaggcgag ggagtccaac 60
 agcgaacggg tgtcggcctc caagcgccgc tccagcccca gcaaaagacgg gcgctccctg 120
 tgcgagaggc acgtcctcgg ggtgttcacg aaagtgcgct tctgcagcgg ccgcaagagg 180
 ccggtgaggg ggagaccaga accccagctc aaagggatgt tgacaagggt attcagccag 240
 cagggatcat tctctgcgat gccaccagat ggtaccattg atgggaccaa ggacgaaaac 300
 35 agcgaactaca ctctctcaa tctaattccc gtgggcctgc gtgtagtggc catccaagga 360
 gtgaaggcta gcccttatgt ggcccatgaat ggtgaaggct atctctacag ttcatgattt 420
 ttcatctcag aatgcaaatc caaggatctc gtgtttgaaa actactatgt gatctatctc 480
 tccaactgct accgccagca agaactcaggc cgaacttggt ttctgggact caataaagaa 540
 ggtcaaatba tgaaggggaa cagagtgaag aaaaaccaagc cctcatcaca tttttgtaccg 600
 40 aaacctatgt aagctgtgat gtacagagaa ccactgcctac atgaaattgg agaaaaacaa 660
 gggcgttcaa ggaaaagttc tggaaacacca accatgaatg gaggcaaaagt tgtgaaatcaa 720
 gattcaaatc ag 732

45 <210> 58
 <211> 738
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

50 <300>
 <302> FGF13
 <310> XM010269

55 <400> 58
 atggcggcgg ctatcgccag ctgcctcatc cgtcagaaga ggcaagcccg cgagcggcgg 60
 aaatccaagc cctgcaagtg tgtcagcagc cccagcaagg gcaagaccag ctgcgacaaa 120
 aacaagttaa atgtcttttc ccgggtcaaa cctcttcggc ccaagaagag gcgcgagaaga 180
 agaccagagc ctacgcttaa ggggtatagt accaagctat acagccgcga aggtaccac 240
 ttgcagctgc agggcgatgg aaccattgat accaccaaag atgaggacag cacttacact 300
 60 ctgtttaacc tcatcctcgt ggggtctgca gtggtggcta tccagagagt tcaaaaccaag 360
 ctgtactctg caatgaacag tgagggatac ttgttaccct cggaactttt cacacctgag 420
 tgcanaatca aagaatcagt gtttgaaatc tatgtatgta catattcact aatgatatac 480

5
 540 agagatcagagc agtccagagcag aggtgtgtgtat ctgtgtctga acaaaagaaag agagatcagtg 540
 600 atctgcctccat gaaagctcatt gacagctcatt gaaagctcatt acaaaagaaag 600
 660 agtctctccag atctctgagagc agtctctccag agtctctccag atctctgagagc 660
 720 caccatgagagc atccatgagagc caccatgagagc caccatgagagc caccatgagagc 720
 738 caccatgagagc

<210> 59
 <211> 624
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF16
 <310> NM003868

<400> 59
 atggagagagagc tggggggggcgt cttggccctcc cttggccctcc cttggccctcc
 60 atcggagggagc agctctcagagc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 120 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 180 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 240 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 300 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 360 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 420 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 480 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 540 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 600 agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc agctgggttccc
 624 agctgggttccc

<210> 60
 <211> 651
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF17
 <310> XM005316

<400> 60
 atggagagagc cccgcctcgtc tgcacacccctc agtctctgtgct taaagctgtgct
 60 gattctcctcgc gattctcctcgc gattctcctcgc gattctcctcgc gattctcctcgc
 120 tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc
 180 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 240 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 300 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 360 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 420 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 480 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 540 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 600 agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct tgcacacccctc agtctctgtgct
 651 agtctctgtgct

<210> 61
 <211> 624
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<300>
 <302> FGF18
 <310> AF075292

[illegible]

60	55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5	<40>	<210> 67		<211> 621		<212> DNA		<213> Homo sapiens	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
55	50	45	40	35	30	25	20	15	10	5	<40>	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
50	45	40	35	30	25	20	15	10	5	<40>	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
45	40	35	30	25	20	15	10	5	<40>	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
40	35	30	25	20	15	10	5	<40>	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
35	30	25	20	15	10	5	<40>	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
30	25	20	15	10	5	<40>	64	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
25	20	15	10	5	<40>	64	64	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
20	15	10	5	<40>	64	64	64	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
15	10	5	<40>	64	64	64	64	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
10	5	<40>	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
5	<40>	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
<40>	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	
													tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat		tccgcgcacat	

<300>
 <302> FGF4
 <310> NM002007

5

<400> 67
 atgtctggggc cggggacggc cggcggtagcg ctgctccggc cggctcgtgct ggccttggctg 60
 cgcccttggg cgggcccagg gggcgccgcc gcacccactg caccacaagg caagctggag 120
 gcgagctgg agcgccgctg ggagagcctg gtggcgctct cggtggcgcg cctgccgggtg 180
 gcagcgagc ccaaggaggc ggccgtccag agcgcgcccg gogactacct gctggcgatc 240
 aagcggtgc ggcggtctta ctgcaacgtg ggcacgtggc tccacctcca ggcgctcccc 300
 gacggccgca tcggcgggcg gcacgcgagc acccgcgaca gcctgctgga gctctcgccc 360
 gtggagcggg gcgtgggtgag catcttcggc gtggccagcc gggtctcgtt ggcctatgagc 420
 agcaagggca agctctatgg ctgcgccctc ttcaccgatg agtgacagtt caaggagatt 480
 ctccctccca acaactacaa cgctacgag tctacaagt accccggcat gttcatcgcc 540
 ctgagcaaga atgggaagac caagaagggg aaccgagtg cgccaccat gaagggtacc 600
 cactctctcc ccaggctgtg a

10

<210> 68
 <211> 597
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

20

<300>
 <302> FGF6
 <310> NM020996

25

<400> 68
 atgtcccggg gagcaggacg tctgcagggc acgctgtggg ctctcgtctt cctaggcatc 60
 ctagtgggca tgggtggtgcc ctgcctgca ggcaccgtg ccaacaacac gctgctggac 120
 tcgaggggct ggggcaccct gctgtccagg tctcgccgg ggctagctgg agagattgcc 180
 ggggtgaact gggaaagtgg ctatttgggt gggatcaaag gcgagcggag gctctactgc 240
 aacgtgggca tcgcttttca cctccagggt cccccacg gcgagatcag cgggaccac 300
 gaggagaacc cctacagcct gctggaaatt tccactgtgg agcgaggcgt ggtgagtctc 360
 tttggagtga gaagtgcctt ctctgttgc atgaacagta aaggaaagatt gtacgcaacg 420
 cccagcttcc aagaagaatg caagttcaga gaaacccctc tgcccaacaa ttacaatgcc 480
 tacgagtcag acttgtacca agggacctac attgccctga gcaaatacgg accgggtaag 540
 cggggcagca aggtgtcccc gatcatgact gtcactcatt tccttcccag gatctaa 597

30

<210> 69
 <211> 150
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

45

<300>
 <302> FGF7
 <310> XM007559

50

<400> 69
 atgtcttggc aatgcacttc atacacaatg actaatctat actgtgatga tttgactcaa 60
 aaggagaaaa gaaatatgt agttttcaat tctgattcct attcaccttt tgtttatgaa 120
 tggaaagctt tgtgcaaaat atacatataa

55

<210> 70
 <211> 628
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

60

<300>

2160 ccaacatctgaaac
 2220 gaaagatcgaagaa
 2280 cccctcacaagaa
 2340 aacccacacccc
 2400 cccgacccgaag
 2460 cgcacccctga

5

<210> 72
 <211> 2409
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10

15

<300>
 <302> FGFPR4
 <310> XM003910

20

60 tccacgtccctg
 120 tccctggaagag
 180 aagccctctctgg
 240 gacccctctctgg
 300 gacccctctctgg
 360 gacccctctctgg
 420 gacccctctctgg
 480 gacccctctctgg
 540 gacccctctctgg
 600 gacccctctctgg
 660 gacccctctctgg
 720 gacccctctctgg
 780 gacccctctctgg
 840 gacccctctctgg
 900 gacccctctctgg
 960 gacccctctctgg
 1020 gacccctctctgg

25

30

35

40

45

50

55

60

1080 gacccctctctgg
 1140 gacccctctctgg
 1200 gacccctctctgg
 1260 gacccctctctgg
 1320 gacccctctctgg
 1380 gacccctctctgg
 1440 gacccctctctgg
 1500 gacccctctctgg
 1560 gacccctctctgg
 1620 gacccctctctgg
 1680 gacccctctctgg
 1740 gacccctctctgg
 1800 gacccctctctgg
 1860 gacccctctctgg
 1920 gacccctctctgg
 1980 gacccctctctgg
 2040 gacccctctctgg
 2100 gacccctctctgg
 2160 gacccctctctgg
 2220 gacccctctctgg
 2280 gacccctctctgg
 2340 gacccctctctgg
 2400 gacccctctctgg
 2460 gacccctctctgg

5	<210> 73	
	<211> 1695	
5	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
300>	<302> MT2MMP	
	<310> D86331	
10	<400> 73	
	atggaagcggag cccgctgtctgg ggttcccaagac cagttccgggg	lactcggggg
15	gagcattccatc agaaacacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
20	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
25	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
30	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
35	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
40	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
45	<210> 74	
	<211> 1824	
45	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
300>	<302> MT3MMP	
	<310> D85511	
50	<400> 74	
	atggaagcggag cccgctgtctgg ggttcccaagac cagttccgggg	lactcggggg
55	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
60	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc
	gagcattccatc agaaacacac ggaagtagtctg aggtcgttatcc	ggaagtagtctg aggtcgttatcc

[illegible]

caagcccccctga	cgctctctga	1818
<220> 76	<212> DNA	5
<211> 1938	<213> Homo sapiens	10
<302> M75MMP	<310> AB021227	15
<400> 76	atccacgaagga	60
gagccagagagc	gagccagagagc	120
ccgagccgctcc	ccgagccgctcc	180
aaacagagagag	aaacagagagag	240
ggggcagaaacg	ggggcagaaacg	300
ccgagccagagc	ccgagccagagc	360
gagccagagagc	gagccagagagc	420
gagccagagagc	gagccagagagc	480
gagccagagagc	gagccagagagc	540
gagccagagagc	gagccagagagc	600
gagccagagagc	gagccagagagc	660
gagccagagagc	gagccagagagc	720
gagccagagagc	gagccagagagc	780
gagccagagagc	gagccagagagc	840
gagccagagagc	gagccagagagc	900
gagccagagagc	gagccagagagc	960
gagccagagagc	gagccagagagc	1020
gagccagagagc	gagccagagagc	1080
gagccagagagc	gagccagagagc	1140
gagccagagagc	gagccagagagc	1200
gagccagagagc	gagccagagagc	1260
gagccagagagc	gagccagagagc	1320
gagccagagagc	gagccagagagc	1380
gagccagagagc	gagccagagagc	1440
gagccagagagc	gagccagagagc	1500
gagccagagagc	gagccagagagc	1560
gagccagagagc	gagccagagagc	1620
gagccagagagc	gagccagagagc	1680
gagccagagagc	gagccagagagc	1740
gagccagagagc	gagccagagagc	1800
gagccagagagc	gagccagagagc	1860
gagccagagagc	gagccagagagc	1920
gagccagagagc	gagccagagagc	1980
gagccagagagc	gagccagagagc	2040
gagccagagagc	gagccagagagc	2100
gagccagagagc	gagccagagagc	2160
gagccagagagc	gagccagagagc	2220
gagccagagagc	gagccagagagc	2280
gagccagagagc	gagccagagagc	2340
gagccagagagc	gagccagagagc	2400
gagccagagagc	gagccagagagc	2460
gagccagagagc	gagccagagagc	2520
gagccagagagc	gagccagagagc	2580
gagccagagagc	gagccagagagc	2640
gagccagagagc	gagccagagagc	2700
gagccagagagc	gagccagagagc	2760
gagccagagagc	gagccagagagc	2820
gagccagagagc	gagccagagagc	2880
gagccagagagc	gagccagagagc	2940
gagccagagagc	gagccagagagc	3000
gagccagagagc	gagccagagagc	3060
gagccagagagc	gagccagagagc	3120
gagccagagagc	gagccagagagc	3180
gagccagagagc	gagccagagagc	3240
gagccagagagc	gagccagagagc	3300
gagccagagagc	gagccagagagc	3360
gagccagagagc	gagccagagagc	3420
gagccagagagc	gagccagagagc	3480
gagccagagagc	gagccagagagc	3540
gagccagagagc	gagccagagagc	3600
gagccagagagc	gagccagagagc	3660
gagccagagagc	gagccagagagc	3720
gagccagagagc	gagccagagagc	3780
gagccagagagc	gagccagagagc	3840
gagccagagagc	gagccagagagc	3900
gagccagagagc	gagccagagagc	3960
gagccagagagc	gagccagagagc	4020
gagccagagagc	gagccagagagc	4080
gagccagagagc	gagccagagagc	4140
gagccagagagc	gagccagagagc	4200
gagccagagagc	gagccagagagc	4260
gagccagagagc	gagccagagagc	4320
gagccagagagc	gagccagagagc	4380
gagccagagagc	gagccagagagc	4440
gagccagagagc	gagccagagagc	4500
gagccagagagc	gagccagagagc	4560
gagccagagagc	gagccagagagc	4620
gagccagagagc	gagccagagagc	4680
gagccagagagc	gagccagagagc	4740
gagccagagagc	gagccagagagc	4800
gagccagagagc	gagccagagagc	4860
gagccagagagc	gagccagagagc	4920
gagccagagagc	gagccagagagc	4980
gagccagagagc	gagccagagagc	5040
gagccagagagc	gagccagagagc	5100
gagccagagagc	gagccagagagc	5160
gagccagagagc	gagccagagagc	5220
gagccagagagc	gagccagagagc	5280
gagccagagagc	gagccagagagc	5340
gagccagagagc	gagccagagagc	5400
gagccagagagc	gagccagagagc	5460
gagccagagagc	gagccagagagc	5520
gagccagagagc	gagccagagagc	5580
gagccagagagc	gagccagagagc	5640
gagccagagagc	gagccagagagc	5700
gagccagagagc	gagccagagagc	5760
gagccagagagc	gagccagagagc	5820
gagccagagagc	gagccagagagc	5880
gagccagagagc	gagccagagagc	5940
gagccagagagc	gagccagagagc	6000
gagccagagagc	gagccagagagc	6060